

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMUNIDADES BACTERIANAS EM SOLOS DE MATA NATIVA
E CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR

Helena Suleiman de Macedo
Bióloga

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMUNIDADES BACTERIANAS EM SOLOS DE MATA NATIVA
E CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR

Helena Suleiman de Macedo

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

M141c Macedo, Helena Suleiman de
Comunidades bacterianas em solos de mata nativa e cultivados
com cana-de-açúcar / Helena Suleiman de Macedo. -- Jaboticabal,
2012
vii, f. 78. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientadora: Lúcia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Newton La Scala Júnior, Danielle Gregório
Gomes Caldas
Bibliografia

1. gene 16S rRNA. 2. *Saccharum spp.* 3. T-RFLP. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:631.461

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: COMUNIDADES BACTERIANAS EM SOLOS DE MATA NATIVA E CULTIVADOS
COM CANA-DE-AÇÚCAR

AUTORA: HELENA SULEIMAN DE MACEDO

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA , pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. NEWTON LA SCALA JUNIOR

Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. DANIELLE GREGORIO GOMES CALDAS

Centro de Energia Nuclear Na Agricultura / Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 20 de dezembro de 2012.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

HELENA SULEIMAN DE MACEDO – nascida em Ribeirão Preto (SP), em 14 de novembro de 1986, graduada em Ciências Licenciatura Plena em Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá em Ribeirão Preto (SP), no ano de 2009. Em 2010 ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no câmpus de Jaboticabal (SP).

“O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar.”

Albert Einstein

As pessoas mais importantes da minha vida

Meus pais, Henrique e Fátima;

meus irmãos, Bárbara, Yuri e Daniel;

meu namorado, Paulo Ricardo;

por serem o meu porto seguro.

Pelo amor, apoio e compreensão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu protetor, por ter me dado a certeza de que quando existe fé, força de vontade e dedicação tudo é possível.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Maria Carareto Alves, pela orientação e pela oportunidade de crescimento profissional.

À minha madrinha e Prof^a Eliana G. de Macedo Lemos pelos importantes ensinamentos tanto pessoais quanto científicos, a quem sempre tive e sempre terei um eterno agradecimento.

Aos professores Dr. Manoel Victor Franco Lemos e o Dr. Alan Rodrigo Panosso, pelas sugestões tanto no Exame de Qualificação como depois, as quais contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Prof^a Dra Siu Mui Tsai pela oportunidade, aprendizado e pela confiança depositada.

Aos Prof^o Newton La Scala Jr e Prof^o Jackson A. Marcondes Souza, que tiveram a iniciativa para que esse trabalho pudesse ser realizado e contribuíram no desenvolvimento.

Aos Dr. Eduardo Figueiredo e Lucas W. Mendes a quem sou muito grata, que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

A todos os professores, funcionários e colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP- Jaboticabal, SP) e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA-USP Piracicaba, SP) que me ajudaram muito nessa caminhada, trocando experiências e me dando força.

Aos meus pais Henrique e Fátima, são as pessoas que mais admiro na vida, são meus exemplos, a minha história. Agradeço pelo apoio emocional e por todos os ensinamentos dados ao longo da minha vida, por cada cuidado, preocupação e carinho.

Tudo o que sou hoje devo a eles. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Bárbara, Yuri e Daniel, pelo carinho e amizade, vocês ao meu lado fazem toda diferença, agradeço a Deus por ter o privilégio de ter vocês como meus parceiros e saibam que o meu amor por vocês é muito grande.

Ao meu namorado Paulo Ricardo por sempre estar do meu lado, pelo convívio, paciência, incentivo e compreensão. Gordo obrigado viu!!!

À Regina pela força e incentivo e a toda minha Família, a quem devo muito, meus Avós, Tios, Tias, Primas e Primos. Que se fizeram presente em todos os momentos desta caminhada através de muito apoio e amizade. Obrigado a todos!

Ao meu sogro Luis Paulo, minha sogra Maria Inês e meus cunhadinhos Vini e Duda sempre do meu lado me apoiando e me dando muito carinho e alegria!

As Belas da pensão, onde fiquei em Piracicaba pela amizade, o conforto nas horas difíceis.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presente em todos os momentos me apoiando, torcendo por mim, me fazendo sorrir e me escutando.

Aos membros da banca examinadora, pelo prestígio em tê-los como avaliadores deste trabalho.

A todos que passaram pela minha vida que com certeza contribuíram um pouquinho para eu me tornar o que sou hoje.

Por fim a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii
I. INTRODUÇÃO.....	1
Objetivos.....	3
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1. A cultura da cana-de-açúcar e emissões de CO ₂	4
2. Diversidade microbiana do solo.....	7
3. T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism.....	9
4. Bibliotecas do gene 16S rRNA.....	12
III. MATERIAL E METODOS.....	14
1. Área de Estudo.....	14
2. Amostragem dos Solos.....	16
3. Extração de DNA Metagenômico do Solo.....	20
4. Amplificação do gene 16S rRNA para o domínio Bacteria.....	22
5. Purificação dos Produtos de PCR.....	23
Parte I - Análise das estruturas bacterianas pela técnica de T-RFLP	
1. Reação de Restrição dos Produtos de PCR para Análise de T-RFLP.....	23
2. Precipitação dos Produtos de Digestão.....	24
3. Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do Gene 16S rRNA de Bacteria.....	24
4. Processamento dos Dados.....	24
Parte II - Análise da diversidade por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	
1. Seleção de amostras.....	25
2. Clonagem dos Produtos de PCR.....	25
3. Preparo das Células Competentes de <i>Escherichia coli</i>	26
4. Transformação de <i>E. coli</i>	27
5. Seleção dos Clones e Lise do DNA.....	28
6. PCR de Inseto.....	28

7. Purificação e PCR de Sequenciamento.....	29
8. Análise das Sequências.....	29
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
Caracterização do solo.....	30
Parte I - Estrutura das comunidades microbianas	
1. Análises dos componentes principais.....	33
2. Relação das Comunidades Microbianas com os Atributos dos Solos.....	38
3. Análise de Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais.....	40
Parte II - Sequenciamento de Bibliotecas do Gene 16S rRNA	
1. Análise dos dados.....	41
2. Análise das comunidades microbianas dos solos baseadas em UTOs.....	43
3. Análise da Diversidade das Comunidades.....	49
V. CONCLUSÕES.....	60
VI. REFERENCIAS.....	61

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 01. Abreviações das áreas de amostragem de solo.....	17
Tabela 02. Caracterização química das amostras de solo utilizadas na pesquisa....	18
Tabela 03. Teores de argila, silte e areia no solo das áreas estudadas.....	19
Tabela 04. Total de emissão CO ₂ , e taxas umidade e temperatura.....	20
Tabela 05. Índices de dissimilaridade das estruturas bacterianas pelos testes de ANOSIM e SIMPER obtidos usando a técnicas de T-RFLP.....	34
Tabela 06. Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') das amostras de T-RFLP.....	37
Tabela 07. Riqueza de UTOs e índices de diversidade calculados a partir das bibliotecas de 16S rRNA.....	42
Tabela 08. Distribuição dos organismos, ao nível taxonômico de classes dentro do filo <i>Acidobacteria</i>	52

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 01. Esquema representativo da técnica de T-RFLP.....	10
Figura 02. Fluxograma explicativo das etapas do trabalho.....	14
Figura 03. Mapa do Brasil com destaque o Estado de São Paulo.....	15
Figura 04. Foto da localização da área de estudo na Usina Ipiranga.....	16
Figura 05. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega ®).....	26
Figura 06. Cálculo da quantidade do produto de PCR para clonagem.....	26
Figura 07. Análises de Componentes Principais das comunidades microbianas dos solos estudados com todas as amostras e nas duas profundidades.....	35
Figura 08. Análises de Componentes Principais com os diferentes tratamentos nas áreas de cana-de-açúcar.....	36
Figura 09. Análise de Redundância baseada nos dados do T-RFLP com elementos dos solos.....	40
Figura 10. Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectadas com a técnica de T-RFLP.....	41
Figura 11. Curvas de rarefação calculadas com distância evolutiva 0,03 para as sequências obtidas para as bibliotecas de gene 16S rRNA.....	45
Figura 12. Diagrama de Venn representando o número de UTOs identificados pelo software MOTHUR nas diferentes áreas estudadas.....	47
Figura 13. Análise de agrupamento das sequências bibliotecas de clones do gene 16S rRNA.....	48
Figura 14. Composição dos diferentes filos baseados na classificação das sequências parciais do gene 16S rRNA.....	50
Figura 15. Composição das diferentes classes dentro do filo <i>Proteobacteria</i> baseados na classificação das sequências parciais do gene 16S rRNA.....	53
Figura 16. Diversidade bacteriana nas sequências do gene 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II pelo programa Library Compare.....	57
Figura 17. Diversidade bacteriana nas sequências do gene 16S rRNA com base	

na afiliação filogenética do RDP II pelo programa Library Compare.....	59
Figura 18. Diversidade bacteriana nas sequências do gene 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II pelo programa Library Compare.....	60

COMUNIDADES BACTERIANAS EM SOLOS DE MATA NATIVA E CULTIVADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - Estudos sobre comunidades bacterianas associadas às culturas agrícolas são fundamentais no entendimento de como os microrganismos presentes nos solos podem influenciar no ambiente. Além disso, o conhecimento sobre a importância dos microrganismos na reciclagem dos elementos químicos do solo e sua influência sobre a emissão de gases do efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO₂), e alterações climáticas globais. Neste estudo foi comparada a população bacteriana em solos cultivados com cana-de-açúcar sob os sistemas de manejo cana crua (CC) e cana queimada (CQ) e solo sob mata nativa (MN), com as emissões de CO₂ e características físico-químicas (pH, M.O e classe textural) de cada área. As populações microbianas dos solos foram analisadas pelas técnicas moleculares T-RFLP (“Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”) e sequenciamento do gene 16S rRNA. Observou-se que as comunidades bacterianas foram influenciadas pelas mudanças no uso da terra e nos tipos de sistemas de manejo adotados. As áreas estudadas apresentaram comunidades bacterianas distintas, sendo os filos *Acidobacteria* e *Proteobacteria* os grupos que foram mais abundantes em todas as amostras. Bactérias pertencentes aos filos *Cyanobacteria* e *Nitrospira* foram encontradas exclusivamente nas áreas CQ, por outro lado bactérias do filo *Bacteroidetes* aparecem apenas nas áreas de manejo mecanizado CC. Por fim, os resultados das duas técnicas sugerem que os solos sob o cultivo com cana-de-açúcar mostraram uma maior diversidade e riqueza, quando comparados com a MN.

Palavras chaves: atributos do solo, ecologia bacteriana, gene 16S rRNA, *Saccharum spp*, T-RFLP.

BACTERIAL COMMUNITIES IN SOIL OF NATIVE FOREST AND CULTIVATED WITH SUGARCANE

SUMMARY – Studies on bacterial communities associated with agriculture are fundamental in understanding how microorganisms in soil can influence the environment. Furthermore, knowledge about the importance of microorganisms in the recycling of chemical elements in soil and its effect on the emission of greenhouse gases such as carbon dioxide (CO₂), and global climate change. This study compared bacterial populations in soils cultivated with sugarcane in the management systems (CC) and burnt cane (CQ) and native forest (MN), with CO₂ emissions and physico-chemical (pH, organic matter and textural class) in each area. The soil microbial populations were analyzed by T-RFLP molecular techniques ("Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism") and sequencing of 16S rRNA. It was observed that bacterial communities were influenced by changes in land use and the types of soil management. The areas studied showed distinct bacterial communities, being the phyla Proteobacteria and Acidobacteria groups that were most abundant in all samples. Bacteria Cyanobacteria belonging to the phyla and Nitrospira were found exclusively in the areas CQ, on the other bacteria of the phylum Bacteroidetes appear only in the areas of mechanized handling CC. Finally, the results of the two techniques suggests that soils under cultivation with sugarcane showed greater diversity and richness compared to MN.

Keywords: soil attributes, bacterial ecology, 16S rRNA, *Saccharum* spp, T-RFLP.

I. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país considerado maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, responsável por cerca de um quarto da produção mundial (FAO, 2010). Estima-se que no ano 2011/2012 a safra teve uma produção anual de 571.5 milhões de toneladas. A região de maior produção no Brasil é a Sudeste, representando 62% da área plantada no Brasil (com Estado de São Paulo sozinho respondendo por 52% da área total), seguido pelo Nordeste, com 13% da área total (CONAB, 2012).

Práticas agrícolas modificam os atributos físico-químicos do solo, proporcionando vantagens seletivas para algumas populações bacterianas sendo tais perturbações causa de desequilíbrios nas interações biológicas nestes ecossistemas (TORSVIK et al., 1998). Além disso, práticas agrícolas podem ser consideradas fontes de Gases de Efeito Estufa (GEE) induzindo emissões adicionais de CO₂ do solo em áreas agrícolas (LA SCALA et al., 2008; REICOSKY e LINDSTROM, 1993), e conseqüentemente reduzindo os estoques de carbono do solo. As comunidades microbianas podem também ser alteradas por elevadas emissões de CO₂ atmosféricos, o que pode ter implicações para no equilíbrio do ecossistema, principalmente sobre a reciclagem de elementos essenciais (LESAULNIER et al., 2008).

Assim nos ciclos biogeoquímicos as bactérias do solo são responsáveis pela reciclagem dos compostos orgânicos, além de influenciar na nutrição das plantas e fertilidade do solo (KIRK et al., 2004). Dessa forma a análise da diversidade dos microrganismos do solo tem sido foco de intensas pesquisas ao longo dos anos, tanto para correlacionar os microrganismos com a transformação de diferentes compostos, como para se avaliar a influência destes no desenvolvimento de práticas agrícolas mais adequadas e sustentáveis.

A cana-de-açúcar tem sido cultivada em mais de 70 países sendo considerada uma das culturas mais importantes devido a seu valor energético, com uma área de cultivo global de mais de 20 milhões hectares (SOUZA et al., 2012). Atualmente, o cultivo de cana está passando por um período de intensas mudanças nas práticas de manejo, devido à introdução da colheita mecanizada, pré-colheita sem queima. No entanto, a queima da cana, ainda é

frequentemente realizada em maior produção, e ela tem impactos profundos, destrói a matéria orgânica do solo, deixando-o exposto à erosão, afetando os microrganismos e causando poluição significativa (SOUZA et al., 2012).

No manejo sem queima, onde a colheita é realizada geralmente por máquinas colhedoras de cana-de-açúcar, a parte foliar pode ser depositada anualmente sobre o solo e se decompor naturalmente. As condições ambientais (umidade, temperatura), a quantidade de palhada depositada e a constituição dessa palhada, interferem diretamente no processo de decomposição, agindo sobre a acumulação da palhada ao longo do tempo (CAMPOS, 2003).

A prática da queima da palha antes da colheita está sendo eliminada gradualmente, principalmente no Estado de São Paulo, devido ao protocolo agroambiental de adesão voluntária que foi criado para eliminar esta prática na maioria das áreas em 2014 (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). De acordo com a Secretaria de Meio Ambiente de São Paulo (2010), cerca de 55,8% das áreas de cana no Estado de São Paulo foram colhidas utilizando-se o sistema de colheita mecanizada crua durante a safra 2009/2010 (FIGUEIREDO, 2012).

Por outro lado, no Brasil dois diferentes sistemas de manejo de cana são atualmente praticados: a colheita manual da cana-de-açúcar após a queima de sua palhada (cana queimada) e a colheita mecanizada da cana sem queimada (cana crua), onde grandes quantidades de palha são deixadas sobre a superfície do solo, pós colheita. Considerando-se a influência que o manejo das culturas possa ter sobre as comunidades microbianas do solo e a influência dessas comunidades nos ciclos biogeoquímicos de diversos elementos, é de grande importância a compreensão da relação da diversidade e a estrutura das comunidades dos microrganismos encontrados no solo e as emissões de CO₂ atmosféricos, especialmente nos sistemas de colheita da cana-de-açúcar.

A análise da diversidade de comunidades bacterianas no solo foi tradicionalmente iniciada com o cultivo de microrganismos, porém essa técnica é limitada devido sua incapacidade de cultivar muitas espécies de bactérias em laboratório (TORSVIK e ØVREAS, 2002). Os avanços na área de biologia molecular e a possibilidade de se estudar o conjunto de genomas de um

ambiente (metagenoma) permitiram a investigação *in situ* da diversidade e da estrutura de comunidades de bactérias no solo (UPCHURCH et al., 2008).

Métodos de análise de microrganismos independentes de cultivo, podem ser usados para a análise de um grande número de amostras e possibilitam meios para detectar diferenças na estrutura das comunidades microbianas. Estas técnicas são conhecidas como “DNA fingerprinting” (impressões digitais) são baseadas no princípio da separação de fragmentos de DNA por eletroforese como: a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), a Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) e a Análise do Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP). As técnicas “DNA fingerprinting” tem sido utilizadas com sucesso em inúmeros estudos para explorar a diversidade das populações microbianas em vários habitats (SCHÜTTE et al., 2008).

As bibliotecas de DNA metagenômico são conhecidas pela investigação do conjunto de genomas encontrado na microbiota total do solo, essa técnica tem como objetivo compreender melhor a ecologia microbiana global, além de impulsionar processos biotecnológicos para demandas de novos aditivos, enzimas e biomoléculas. Destaca-se por ser um novo campo de pesquisa desenvolvido ao longo da última década para elucidar os genomas de organismos não cultiváveis (SCHMEISSER et al., 2007).

Desse modo a utilização de técnicas moleculares como a clonagem e o sequenciamento de amostras do gene 16S rRNA contribuíram para o melhor entendimento da diversidade e da função das comunidades bacterianas em ambientes como solo, águas e biofilmes (TRINGE et al., 2005). O grande número de projetos realizados com bibliotecas de DNA metagenômico em diversos ecossistemas tem facilitado a compreensão da complexidade de comunidades microbianas ambientais (DELMONT et al., 2011).

Objetivos

Tendo como hipótese do trabalho que as mudanças do uso do solo no cultivo da cana-de-açúcar e que a ação do fogo no canavial provoca modificações nas propriedades do solo e conseqüentemente nas populações bacterianas do solo este trabalho teve por objetivos específicos: i) comparar e estimar, pelas técnicas moleculares a diversidade bacteriana em solos

causada pelas mudanças do uso da terra, no uso agrícola e no manejo em solos de cultivo de cana-de-açúcar sob os sistemas de manejos: colheita mecanizada (cana crua -CC), a colheita manual (cana queimada - CQ) ou no solo de uma Mata Nativa (MN); ii) relacionar os resultados microbiológicos com os atributos físico-químicos dos solos juntamente com a emissão de CO₂ das áreas estudadas.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. A cultura da cana-de-açúcar e emissões de CO₂

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta que cresce em todo o mundo em regiões entre 22° N e S do Equador, pertence à família *Poaceae* junto com os gêneros *Zea* e *Sorghum*. Seis espécies de *Saccharum* são reconhecidas: *Saccharum.officinarum*, *Saccharum.sinense*, *Saccharum.barberi*, *Saccharum.eduli*, *Saccharum.spontaneum* e *Saccharum.robustum*. O centro de origem está localizado nas regiões leste da Indonésia e da Nova Guiné (DANIELS ; ROACH, 1987; MARTINS, 2004). A importância da cana de açúcar pode ser atribuída à sua múltipla utilização, podendo ser empregada sob a forma de forragem para alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de açúcar, álcool, rapadura, melado e aguardente. Atualmente, a principal destinação da cana-de-açúcar cultivada no Brasil é a fabricação de açúcar e álcool (etanol), sendo no setor sucro-alcooleiro a principal parte do agro-negócio brasileiro, além de ser referência para os demais países produtores de açúcar e álcool (BRASIL, 2007). A cana-de-açúcar (*S. officinarum* L.) é considerada como opção promissora de produção de biocombustíveis e energia de origem renovável, o cultivo no Brasil ocorre em uma área estimada de 8.368,4 mil hectares, distribuída em vários Estados produtores (CONAB, 2012).

O Brasil é o principal exportador de etanol, no ano safra 2012/2013 segundo CONAB (2012) uma produção estimada em 23,49 bilhões de litros. Esta produção de etanol concentra-se na região Centro-Oeste e Sudeste com 91,0% do total produzido, principalmente nos estados de São Paulo (50,53%).

Estimativas indicam que no Brasil a agricultura é responsável por 75 % das emissões dos gases de efeito estufa (GEE) (CERRI; CERRI, 2007). A emissão de CO₂ do solo é considerada, o segundo maior componente do ciclo global do carbono sendo, portanto, relevante nas variações climáticas (RETH; MARKUS; FALGE, 2005). Esta liberação de CO₂ na atmosfera é atribuída ao metabolismo das raízes das plantas, aos processos de decomposição microbiana, a microflora e a fauna (RASTOGI; SINGH; PATHAK, 2002), e é influenciada por fatores como umidade e temperatura.

O fluxo de CO₂ nos solos agrícolas é resultado de complexas interações entre o clima e as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. O manejo dos solos para as práticas agrícolas podem afetar as propriedades do solo e influenciar na liberação de CO₂, e em consequência alterar o conteúdo de C no solo (SILVA-OLAYA, 2010; CHENG-FANG et al., 2010). A queima anual dos canaviais durante a colheita pode provocar periodicamente interferências nos ecossistemas, além de ocasionar a liberação de poluição atmosférica altamente prejudicial à saúde afetando todo entorno da região canavieira (SZMRECSÁNYI, 1994). Existem projeções de que 80% da área plantada na região Centro-Sul do país, onde está a maior parte da produção sejam colhidas sem queima até 2014 (GALDOS; CERRI; CERRI, 2009; MACEDO; NOGUEIRA, 2004).

A queima do canavial usada para facilitar o corte manual da cana-de-açúcar, libera para a atmosfera grande quantidade dos gases como o CO₂, o N₂O e o CH₄, considerados gases do efeito estufa (GEE). O processo de queima eleva as concentrações atmosféricas desses gases, contribuindo para o aumento do efeito estufa adicional o que constitui um dos principais problemas ambientais atuais associados às mudanças climáticas (CAMPOS, 2003). As atividades antrópicas, como a queima de combustíveis fósseis, o desenvolvimento das cidades, as mudanças do uso dos solos, a utilização de defensivos químicos na agricultura e a poluição afetam a diversidade microbiana do solo. Entretanto, são necessários novos estudos para o melhor entendimento de como as mudanças na diversidade microbiana podem influenciar a reciclagem dos elementos nos ecossistemas (KIRK et al., 2004).

Quando a cana é colhida crua, na superfície do solo fica uma grande quantidade de palhada, que protege o solo da erosão impedindo a ação direta

dos ventos e o transporte de partículas (erosão eólica). A camada de palha na superfície do solo leva à formação de um microclima local, que impede alterações bruscas na temperatura e na umidade do solo. A formação desse ambiente possibilita o desenvolvimento de uma comunidade biológica especial, principalmente de fungos, que atuará na decomposição da palhada. Outra importante contribuição da implementação deste sistema de manejo no cultivo da cana é que ele pode funcionar como um mitigador de carbono, contribuindo para a redução do efeito estufa, uma vez que grande parte do carbono que seria liberado na atmosfera é incorporado à matéria orgânica do solo (CAMPOS, 2003).

Os níveis de carbono orgânico nos solos são os resultados das complexas interações entre variáveis relacionadas aos processos de produção e transporte do gás do solo para a atmosfera. Esse processo de perda de carbono do solo para a atmosfera é dominado pelo fluxo de CO_2 para a superfície, resultante da atividade microbiana (oxidação química), respiração das raízes e da fauna (SILVA-OLAYA, 2010; PANOSSO, 2011). O processo de emissão de CO_2 do solo, também conhecido como respiração do solo, é a segunda maior fonte de emissão de CO_2 para a atmosfera, sendo a queima de combustíveis fósseis a principal responsável antrópica por essas emissões. Essas mudanças do uso da terra, como a conversão de áreas de florestas, cerrados e campos para áreas agrícolas ou pastagem, geralmente diminuem o teor de matéria orgânica nos solos tropicais e subtropicais devido às consequências de curtos e longos prazos dos distúrbios ocasionados pelas operações de preparo associadas a baixos níveis de adição de material orgânico ao solo (PANOSSO, 2011).

Em áreas agrícolas e florestas, a estratégia principal para o aumento do sequestro de carbono é minimizar a decomposição e a mineralização do carbono orgânico do solo, por meio de medidas que promovam a proteção desse carbono. Distúrbios no solo podem provocar perdas de matéria orgânica no solo devido ao aumento da aeração, a qual pode acelerar a atividade bacteriana do solo (PANOSSO, 2011).

2. Diversidade microbiana do solo

O solo é um sistema que apresenta um ambiente heterogêneo com grande riqueza em diversidade microbiana (NACKE et al., 2011), apresenta grande quantidade de microrganismos que pertencem ao três domínios da vida, Bactéria, Archaea e Eukarya (FIERER et al., 2006). Os procariotos se dividem em duas partes na árvore da vida formando os domínios Archaea e Bacteria, sendo que o domínio Bacteria compreende 26 filos, 41 classes, 88 ordens, 240 famílias e 1.194 gêneros (GARRITY et al., 2005). A estrutura de comunidades bacterianas no solo é influenciada por propriedades da vegetação, do clima e tipo do solo, comunidades microbianas são encontradas em diferentes ambientes (CHAN et al., 2008).

Os microrganismos do solo, componentes essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, são fundamentais no processo de fragmentação e decomposição da matéria orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Um dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra é o solo, o número de microrganismos e suas biomassas coletivas variam entre os diferentes tipos e condições de solos, sendo o grupo das bactérias um dos mais numerosos (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998).

Durante muitos anos a diversidade microbiana do solo tem sido explorada, baseada no cultivo e isolamento de espécies microbianas (DANIEL, 2005), os métodos de cultivo são tradicionais para a caracterização microbiana, mas somente uma pequena parcela variando de 0,1% a 1,0% de bactérias do solo são cultiváveis utilizando métodos padrão de cultivo (TORSVIK et al., 1998).

A diversidade microbiana do solo é frequentemente discutida, devido ao grande avanço dos estudos moleculares que favorecem a avaliação dos microrganismos em amostras ambientais (TIEDJE et al., 2001), a microbiota do solo apresenta uma elevada diversidade genética e funcional, caracterizada através de estudos com base no cultivo de microrganismos e de seu DNA (MORAIS, 2008). Essa microbiota influencia tanto na cinética da transformação da matéria orgânica do solo e formação de húmus, quanto na estocagem de carbono e nutrientes (MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003). A estrutura e a funcionalidade das comunidades microbianas variam de acordo com as

propriedades do solo (pH, temperatura e teor de oxigênio), assim como o tipo de manejo e ocupação (HAYDEN et., 2010). Além dessas propriedades a matéria orgânica do solo, de origem principalmente de material vegetal, é uma importante fonte de energia para os microrganismos, principalmente para os envolvidos nos ciclos biogeoquímicos terrestres (RASCHE et al., 2011).

As técnicas utilizadas pelo homem no solo agrícola como aragem e drenagem, alteração do pH ou aplicação de fertilizantes melhoram a fertilidade do solo. Por outro lado, o cultivo excessivo e contínuo do corte e queima, remoção dos resíduos da cultura e algumas práticas de irrigação promovem um declínio na qualidade do solo, que é geralmente acompanhado com perda da diversidade biológica (WAID, 1999). A composição das comunidades microbianas e a sua diversidade, podem ser usadas como indicadores da qualidade do solo, pois respondem rapidamente a essas mudanças ambientais. No entanto, ainda é difícil interpretar o processo de formação dessa composição, visto que pouco é conhecido sobre os papéis específicos dos organismos do solo (SMIT et al., 2001; JOHNSON; LEE; SCOW, 2003).

De acordo com Ovreas (2000), a importância da análise da diversidade microbiana do solo está em: aumentar o conhecimento dos recursos genéticos em uma comunidade, entender padrões da distribuição relativa dos microrganismos, aumentar o conhecimento do papel funcional da diversidade, identificar diferenças na diversidade associada a distúrbios no manejo, entender a regulação da biodiversidade, e entender até que ponto o funcionamento e a sustentabilidade do ecossistema dependem da manutenção no nível específico da diversidade.

O solo é um sistema complexo, que contém uma grande variedade de microhabitats, que podem ser caracterizados por propriedades físicas, químicas e biológicas. É um habitat onde alterações em variáveis ambientais (temperatura, umidade, porosidade e pH) são em parte, responsáveis pelas variações da diversidade de microrganismos (CURY, 2006; MARTINY et al., 2006). Assim o desmatamento e o uso inadequado do solo podem prejudicar as comunidades e conseqüentemente, limitar suas atividades (DANIEL, 2005). E os distúrbios através de tratamentos agrícolas tais como manejo do solo, fertilização e proteção das plantas podem favorecer a certas espécies, resultando em redução de outras comunidades. Tratamentos agrícolas têm

tido relatado na influência das estruturas de comunidades microbianas do solo e diminuição da diversidade bacteriana do solo (HARTMANN; WIDMER; 2006).

3. T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

Os estudos sobre ecologia microbiana do solo têm avançado muito com a utilização de métodos moleculares independentes de cultivo, considerando-se que mais de 99% dos microrganismos do solo não são cultiváveis (MALIK et al., 2008). A utilização de técnicas moleculares, independente de cultivo como a DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), o ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), o T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) e sequências de partes do gene 16S rRNA como marcador filogenético, conduziram a uma nova compreensão da comunidade bacteriana (UPCHURCH et al., 2008).

O T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) é um método independente de cultivo, pelo qual se obtém se uma “impressão digital” genética da composição de uma comunidade microbiana (BLACKWOOD, et al., 2003). A análise do T-RFLP é uma abordagem eficaz para a rápida avaliação e comparação molecular, possibilitando a análise de um grande número de amostras de um ou mais ambientes simultaneamente, a fim obter uma caracterização das estruturas das comunidades bacterianas (LIU et al., 1997; SILVA, 2010).

A utilização de métodos baseados na amplificação de ácidos nucléicos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como a análise de T-RFLP, tornou possível a comparação de diferentes comunidades microbianas provindas de diversos ambientes (MARSH, 1999). T-RFLP já foi utilizado para caracterizar diferentes comunidades de microrganismos, na análise fúngica de genes ribossomais, em Bacteria e Archaea, em ambientes como solos de florestas, solos poluídos, sedimentos, estruturas de plantas, entre outros (THIES, 2007; SCHÜTTE et al., 2008). Esse método é utilizado para amplificar a subunidade menor do gene que codifica o RNA ribossomal do DNA total de comunidades através da reação de polimerase em cadeia (PCR) em que um ou ambos os primers utilizados são marcados com um corante fluorescente. Os

primers escolhidos para análise de T-RFLP devem ser específicos para o grupo-alvo taxonômico, para que possam amplificar todos os organismos de interesse (SCHÜTTE et al., 2008).

A técnica de T-RFLP consiste de uma sequência de procedimentos (Figura 1) iniciados com a extração de DNA da amostra a ser analisada, o gene de interesse é amplificado usando a técnica de PCR com *primers 16S rRNA*, onde o *forward* é marcado com fluorescência, que podem ser 6-FAM, ROX, TAMARA, e HEX, sendo que o mais utilizado é o 6-FAM. Assim, todos os amplicons de tamanho iguais são marcados com fluorescência na extremidade final.

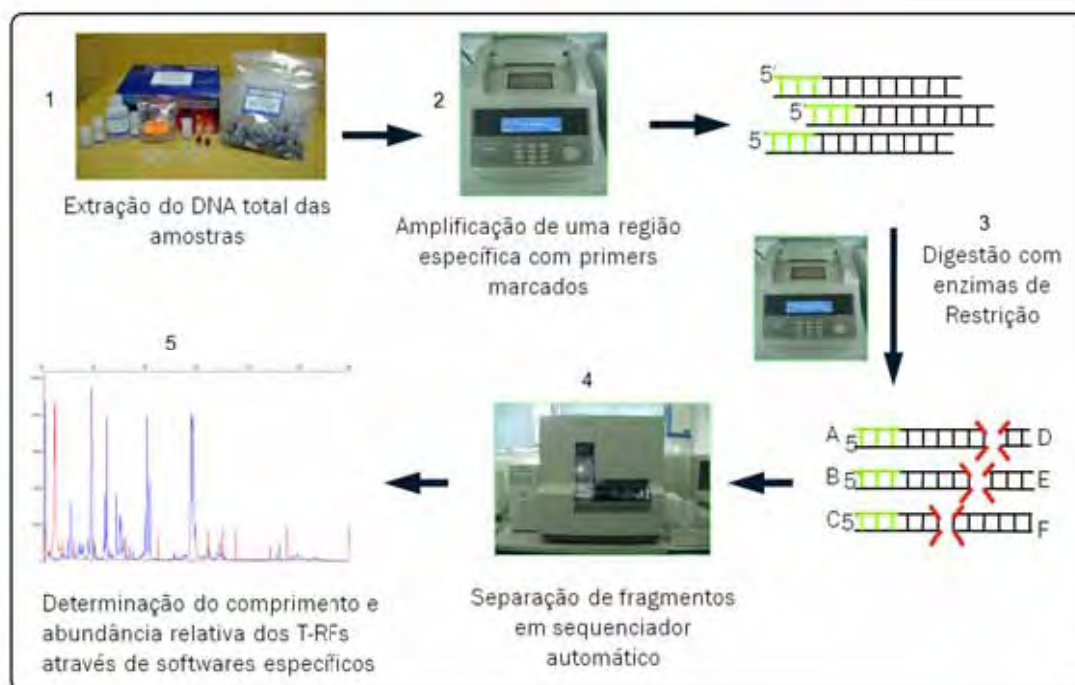


Figura 1. Esquema representativo da técnica de T-RFLP. (adaptado de GRÜNTZIG et al., 2002 apud MENDES, 2009) .

Após a purificação do produto amplificado, ocorre a digestão das amostras, com 2 a 4 enzimas de restrição, sendo a *HhaI* umas das enzimas que promovem resolução máxima. Então, produtos da digestão são aplicados em um sequenciador automático, onde a fluorescência dos T-RFs (fragmentos terminais de restrição) é convertida em um eletroferograma (FORNAZARI, 2011). Os fragmentos obtidos são separados por eletroforeses capilar onde a corrida é realizada em um modo de varredura com tamanho interno padrão

incluído em cada linha de leitura (LIU et al., 1997; TIEDJE et al., 1999). As diferenças nos tamanhos das T-RFs marcados com o fluoróforo refletem as diferenças das sequências de 16S rRNA de populações filogeneticamente distintas que são convertidas em um eletroferograma, onde cada pico representa um T-RF (MENDES, 2009).

Os eletroferogramas são importados por softwares como o GeneScan™ ou Gene Mapper™ (ABI) e PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) ou um software tal como GelComparII (Applied-Maths). Estes programas calculam o tamanho do fragmento de restrição terminal, assim como a intensidade de fluorescência (altura ou área) do pico, os dados são processados pela conversão dos eletroferogramas em matriz, onde cada coluna é uma amostra e as linhas são um T-RF encontrado (MENDES, 2009; FORNAZARI, 2011). A característica atribuída a cada membro da comunidade é o comprimento do T-RF do amplicon de PCR digerido com enzimas de restrição. Cada T-RF encontrado durante a análise de fragmentos é chamado de unidade taxonômica operacional (UTO).

Os sítios nos quais as enzimas de restrição cortam a fita dupla de DNA não são necessariamente únicos para um grupo taxonômico particular. Desse modo, muitas sequências podem compartilhar o mesmo comprimento de T-RF, o que é chamado sobreposição de UTOS ou homoplasia de UTOS assim, há necessidade de se utilizar mais de uma endonuclease nas análises (FORNAZARI, 2011; THIES, 2007). A análise das comunidades pela técnica, baseia-se na presença de picos em um diagrama, caracterizando a amostra pelo número de picos e diversidade no comprimento dos fragmentos gerados, e a presença e as variações de comprimento dos fragmentos de DNA gerados estariam relacionadas a espécies diferentes (A. DICKIE; R. G. FITZJOHN, 2007).

4. Bibliotecas do gene 16S rRNA

As bibliotecas do gene 16S rRNA correspondem a uma metodologia molecular muito utilizada para estudar as comunidades bacterianas, e é realizada pela amplificação, clonagem e sequenciamento do gene 16SrRNA de amostras ambientais, sendo que a partir disso é possível identificar, pela

comparação de sequências dos genes ribossomais, genes de organismos que não podem ser cultivados pelas técnicas tradicionais. Essa técnica têm o potencial para determinar a composição e diversidade de comunidades microbianas do solo, o que é essencial para compreender o papel dessas comunidades, seus efeitos nos processos do ecossistema e a diversidade das comunidades resultantes de diferentes tipos de manejo agrícola e distúrbios naturais e humanos (UPCHURCH et al., 2008).

A construção e sequenciamento de bibliotecas do gene 16S rRNA é uma abordagem independente de cultura, que estuda diversidade microbiana e tem sido um método padrão que avalia comunidades bacterianas em uma grande variedade de habitats (PISA et al., 2011). As bibliotecas de genes do 16S rRNA muitas vezes produzem imagens incompletas das comunidades bacterianas naturais, representando apenas uma amostragem da diversidade (JANSSEN, 2006). Por outro lado essa técnica de construção e sequenciamento das bibliotecas é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas, que possibilita a comparação entre genótipos de microrganismos não cultiváveis, que representam 99% do total de espécies presentes em amostras ambientais (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004; SCHLOSS et al., 2009).

O conhecimento básico de bactérias do solo, como a descoberta de importantes antibióticos, veio a partir de investigações de culturas puras, essas ainda são muito importantes no desenvolvimento e no entendimento da fisiologia bacteriana, genética e ecologia. Começando na década de 1990, estudos em ecologia molecular utilizando técnicas independentes de cultivo (extração de DNA, reação de polimerase em cadeia - PCR, clonagem e sequenciamento) permitiram investigações da diversidade de comunidades microbianas do solo hoje, que antes não podia ser acessada a partir de cultivo e morfologia (HUGHES et al., 2001; JANSSEN, 2006).

As bibliotecas de DNA metagenômico podem ser definidas como a análise funcional das sequências nucleotídicas de genomas microbianos existentes em uma determinada amostra ambiental (HANDELSMAN et al., 1998). Essa técnica veio como uma ferramenta alternativa, no âmbito de elucidar os genomas de organismos não cultiváveis, tendo como objetivo compreender melhor a ecologia microbiana. Proporcionar recursos para a

descoberta de uma diversidade enzimática, compostos químicos e isolamento de genes para o uso em biotecnologia que não havia sido imaginado. Permitindo relacionar funções potenciais de microrganismos específicos dentro das comunidades do solo (SCHMEISSER, et al. 2007; FERRER, et al., 2009).

A técnica de clonagem do gene 16S rRNA consiste na seleção e coleta de amostras do ambiente e na extração dos fragmentos de DNA. Os fragmentos de DNA extraídos são selecionados e unidos a outros fragmentos de DNA, denominados vetores de clonagem, geralmente um plasmídeo, formando uma molécula de DNA recombinante, com capacidade independente de replicação, essas moléculas de DNA são transformadas em uma bactéria hospedeira cultivável, como a *Escherichia coli*. Em seguida, a cultura de *E. coli* é cultivada em meio com ágar e os insertos são isolados e sequenciados. Essas sequências são comparativamente analisadas e a identificação filogenética pode ser inferida (MUYZER; SMALLA, 1998; GONÇALVES, 2011).

Informações sobre as funções metabólicas e composições das espécies microbianas já podem ser comparadas entre metagenomas de diferentes ecossistemas. Estas comparações são importantes para a compreensão da adaptação microbiana e o papel dos microrganismos específicos em diferentes ecossistemas. É importante ressaltar que esta mina de ouro de informação biológica está se tornando cada vez mais acessível publicamente através de várias bases de dados, plataformas de anotação, e a mineração desses dados que podem auxiliar no fornecimento de respostas (DELMONT, et al 2011).

A construção de bibliotecas de gene 16S rRNA permitem a identificação filogenética e determinar a abundância relativa de unidade taxonômica operacional (UTO) de uma comunidade (SANZ; KOCHLING, 2007; GONÇALVES, 2011). Apesar de que a grande maioria dos microrganismos presentes no solo pode não ser cultivadas sob condições de laboratório. Há uma vasta quantidade de informação contida nos genomas de microrganismos não cultiváveis, as bibliotecas de DNA metagenômico é uma das tecnologias mais utilizadas para acessar e investigar esse potencial (HANDELSMAN 2004; FERRER 2009).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado por colaboração entre o Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia e o Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP de Jaboticabal - SP com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP, Piracicaba-SP. Uma representação explicativa das etapas do trabalho pode ser vista na Figura 2.

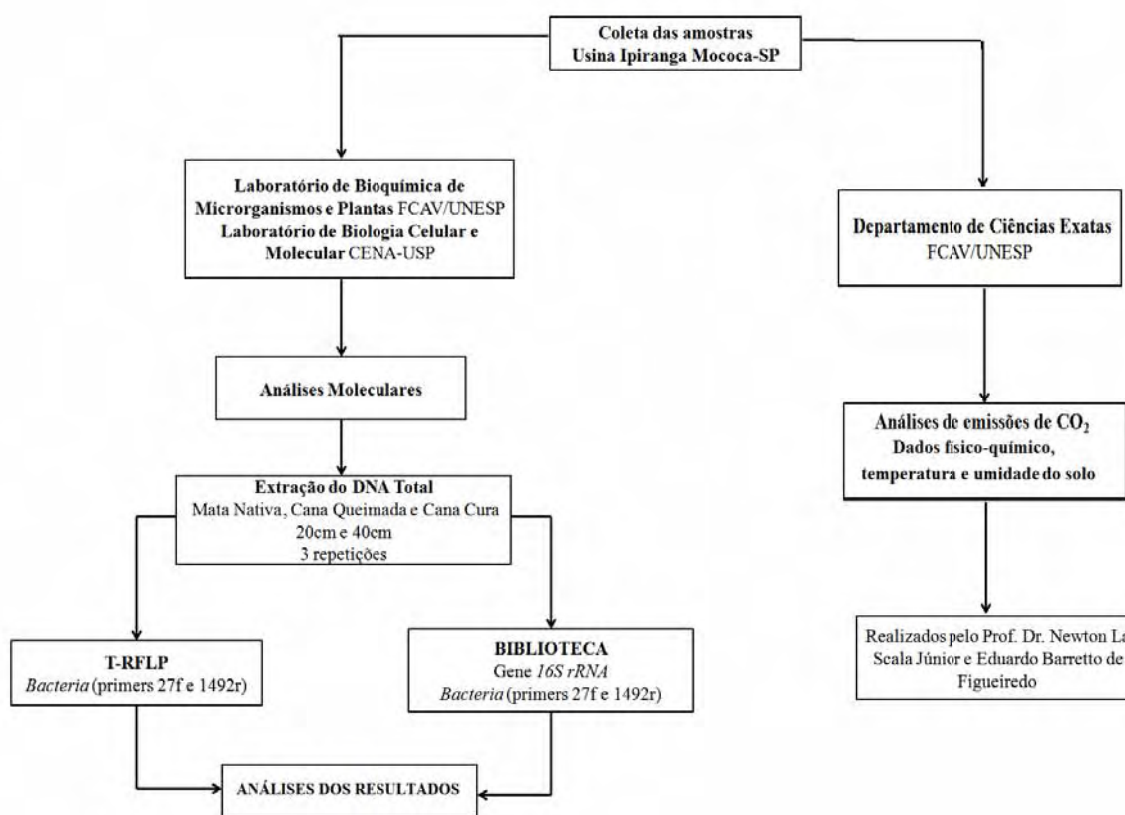


Figura 2. Fluxograma explicativo das etapas do trabalho

1. Área de Estudo

A área de estudo pertence à Usina Ipiranga que está localizada no nordeste do Estado São Paulo, no município de Mococa (Figura 3) entre as coordenadas geográficas 21°25' Sul e 47°05' Oeste (Figura 4). A altitude média da área é de 645 m, sendo a precipitação média anual na região de 2.500 mm, com chuvas concentradas entre os meses de outubro e março e um período

relativamente seco entre abril e setembro. O clima segundo Thornthwaite (1948) foi classificado como B_{1r}B_{4a}, tropical úmido e a temperatura média anual está em torno de 21°C. O solo é avaliado como Argissolo Vermelho-Amarelo, sem mudança textural abrupta (EMBRAPA, 2006). Esta usina foi escolhida como área de estudo por estar enquadrada na área de interesse do programa de pesquisa BIOTA/PMCG – FAPESP. Adicionalmente esta área apresenta o cultivo de cana-de-açúcar com diferentes práticas de manejo.



Figura 3 - No canto esquerdo mapa do Brasil com destaque o Estado de São Paulo e ao lado deste destaque para o município de Mococa.

A área experimental cultivada com cana-de-açúcar tem sido explorada por aproximadamente 20 anos, convertida da mata nativa, utilizando-se o sistema de manejo manual com queima que seria mudança do uso da terra. Por outro lado, a mudança do uso agrícola pelo manejo mecanizado sem queima estava sendo praticado em algumas partes da referida área nos desde 2007. A cultura foi conduzida num ciclo de cultivo de três anos, um ano de cana planta e dois de soqueira, sendo as variedades cultivadas SP81-3250 para áreas de cana queimada (CQ) e SP91-3011 para áreas de cana crua (CC). Aproximadamente cinco meses após a colheita, o solo foi preparado nas áreas com o cultivo de cana-de-açúcar utilizando-se um preparo convencional em cada uma das referidas parcelas experimentais com as seguintes operações: 1) Grade pesada com profundidade de corte de 25 cm; 2) Grade média na profundidade de corte de 20 cm; 3) preparo com subsolador em uma

profundidade de 40 cm; 4) grade niveladora na profundidade de 10 cm (duas vezes). Esta sequência pode ser considerada como preparo de solo convencional usualmente realizado em áreas de cana na região de Mococa. Na mudança do manejo algumas parcelas, após o tratamento mecânico, receberam o tratamento químico à base de calcário dolomítico ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) e gesso agrícola ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (FIGUEIREDO, 2012).

2. Amostragem dos Solos

As amostras de solo foram coletadas em de fevereiro de 2010, nove dias após o preparo do solo e aplicação dos corretivos. Amostras foram coletadas em três áreas com sítios diferentes: Mata Nativa (MN), Cana Queimada (CQ) e Cana Crua (CC) (Figura 4). Sendo que os solos com cana-de-açúcar apresentavam tratamentos diferentes (Tabela 1). A área de Cana Crua foi dividida em: sem palhada e com palhada, todos os pontos foram coletados em duas profundidades 20 cm e 40 cm e todas as amostras foram coletadas com três repetições aleatórias na área.



Figura 4 - Foto da localização da área de estudo na Usina Ipiranga. Os pontos em vermelho indicam o local de coleta das amostras: Mata Nativa, Cana Queimada e Cana Crua respectivamente (fonte: Google Earth). Coordenadas Geográficas da região: 21°25' Sul e 47°05" Oeste.

Tabela 1 - Abreviações das áreas de amostragem de solo.

MATA NATIVA	
MN	
CANA QUEIMADA	
CQSP	SEM PREPARO
CQCN	CN
CQCCAL	CN+ CAL
CQCCG	CN+ CAL+ G
CANA CRUA	
PCCSP	SEM PREPARO C/ PALHADA
CCSP	SEM PREPARO
PCCCN	CN C/ PALHADA
CCCN	CN
PCCNCAL	CN+ CAL C/ PALHADA
CCNCAL	CN+ CAL
PCCNCG	CN+ CAL+ G C/ PALHADA
CCNCG	CN+ CAL+ G

Convencional (CN); Calcário (CAL); Gesso (G).

Para a coleta do solo foram utilizados tubos de PVC previamente esterilizados, de 50 cm de comprimento por 5 cm de diâmetro, sendo introduzidos de forma vertical no solo. Após a coleta, os tubos foram vedados com fita adesiva para evitar deformação e perda das amostras. As amostras foram armazenadas e mantidas em caixas térmicas com gelo e enviadas imediatamente para o Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP – a fim de se iniciar as análises moleculares.

Uma alíquota de cada profundidade de 20 cm e 40 cm das amostras de solo coletadas, foi armazenada em ultra-freezer (Thermo Forma, Forma Scientific) a -80°C para serem utilizadas na extração de DNA metagenômico e outra alíquota somente as amostras 20 cm, foi enviada para o Laboratório de Análises de Solo e Planta UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP para a análise dos atributos físico-químicos.

Foram realizadas análises físicas e químicas (Tabela 2 e 3) com uma amostra representante de cada triplicata na profundidade de 20 cm. Para as amostras representantes das áreas: o preparo convencional baseia-se nas

arações, gradagens e pelo excessivo tráfego de máquinas no solo, afetando as propriedades físicas do solo em sua estrutura da camada superficial, assim há uma aceleração na decomposição da matéria orgânica (REICOSKY; LINDSTROM, 1993), a calagem elimina a acidez do solo, fornece suprimento de cálcio e magnésio para as plantas estimulando o crescimento das raízes e assim uma maior exploração da água e dos nutrientes do solo (DIAS; ROSSETO, 2006), com a prática da gessagem do solo, acontece a melhoria da fertilidade do solo e possibilita o aprofundamento do sistema radicular, proporcionando também uma maior exploração dos nutrientes e água disponíveis no solo, quando aplicado o gesso no solo ele é capaz de reduzir os efeitos nocivos do alumínio, além de ser uma fonte de enxofre, aumentando a produtividade (SOUSA et al., 2001).

Tabela 2. Caracterização química das amostras de solo utilizadas na pesquisa

Análise Química do Solo										
Amostra	pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
	em CaCl ₂ g/dm ³	resina mg/dm ³					mmol/dm ³			%
MN	4.0	20	6	1.6	6	4	64	11.6	75.6	15
CQSP	4.6	11	7	1.1	12	3	25	16.1	41.1	39
CQCN	4.6	11	7	1.1	12	3	25	16.1	41.1	39
CQCCAL	6.1	11	9	0.9	40	12	11	52.9	63.9	83
CQCCG	5.7	11	10	0.9	50	12	16	62.9	78.9	80
PCCSP	4.7	12	5	0.4	15	4	25	19.4	44.4	44
CCSP	4.7	12	5	0.4	15	4	25	19.4	44.4	44
PCCCN	4.8	14	7	0.5	16	5	25	21.5	46.5	46
CCCN	4.9	13	5	0.5	19	5	25	24.5	49.5	49
PCCNCAL	5.1	14	6	0.6	22	7	22	29.6	51.6	57
CCNCAL	5.1	14	6	0.6	22	7	22	29.6	51.6	57
PCCNCG	5.3	14	5	0.5	28	7	22	35.5	57.5	62
CCNCG	5.3	14	4	0.4	30	9	25	39.4	64.4	61

SB (Soma de Bases); T (Capacidade de troca de Cátion); V (Saturação por base). Fonte: FIGUEIREDO, 2012.

Tabela 3. Teores de argila, silte e areia no solo das áreas estudadas.

Análise Granulométrica de Solo					
Amostra	Argila	Silte	Areia		Classe Textural
			Fina	Grossa	
	-----g /kg-----				
MN	140	158	356	346	Arenosa
CQSP	150	175	438	237	Arenosa
CQCN	150	175	438	237	Arenosa
CQCCAL	146	179	437	238	Arenosa
CQCCG	148	175	437	240	Arenosa
PCCSP	198	130	454	218	Média
CCSP	198	130	454	218	Média
PCCCN	192	120	462	226	Média
CCCN	179	170	422	229	Média
PCCNCAL	234	130	351	285	Média
CCNCAL	234	130	351	285	Média
PCCNCG	218	155	363	264	Média
CCNCG	227	149	361	263	Média

Fonte: FIGUEIREDO, 2012.

Os valores de emissões de CO₂, umidade (volume %) e temperatura (C°) das áreas estudadas estão representados na Tabela 4, foram cedidos pelo Prof. Dr. Newton La Scala Jr. do Departamento de Ciências Exatas UNESP/FCAV, Jaboticabal-SP. As medidas das emissões de CO₂ do solo e temperatura (20 cm de profundidade) foram tomadas 24 horas após o preparo, sendo o primeiro dia (03 de fevereiro de 2010), até o dia 27 de fevereiro de 2010, totalizando 25 dias após preparo, com 18 dias de medições, utilizando-se dois sistemas portáteis LI-COR (LI-8100). A umidade do solo (% volume) foi determinada (12 cm de profundidade) utilizando-se um sistema portátil Time Domain Reflectometer (TDR) (HydroSense System, Campbell Scientific, Utah, USA) (FIGUEIREDO, 2012). As emissões acumuladas de C-CO₂ do solo durante todo período de estudo foram estimadas pelo método da integral da área abaixo das curvas de emissão versus o tempo utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

Tabela 4. Total de emissão CO₂, e taxas de umidade e temperatura das áreas estudadas.

Amostra	Total de emissão		
	CO ₂ (C-CO ₂ kg ha ⁻¹)	Temperatura (C°)	Umidade (% volume)
MN	1378,6 ab	23,05	13,1
CQSP	525,4 f	26,91	16,5
CQCN	808,8 def	27,14	13,3
CQCCAL	953,9 cde	27,46	13,3
CQCCG	1093,5 bcd	27,19	14,0
PCCSP	446,4 f	26,45	22,5
CCSP	698,8 ef	27,36	16,8
PCCCN	1485,1 a	27,23	12,8
CCCN	944,5 cde	27,24	11,9
PCCNCAL	1266,9 abc	27,57	13,2
CCNCAL	1081,8 bcd	27,72	11,7
PCCNCG	1550,2 a	27,67	12,3
CCNCG	1065,0 bcde	27,93	12,5

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: FIGUEIREDO, 2012.

3. Extração de DNA Metagenômico do Solo

O DNA total da população de bactérias das amostras de solo, foi extraído com três repetições de cada ponto amostral com as profundidades (20 cm e 40 cm), totalizando 6 extrações para o ambiente de MN, 24 para o ambiente de CQ e 48 para o ambiente CC, totalizando 78 extrações. A extração de DNA total de solo foi realizada com o Kit *Power Soil*TM DNA (MoBIO, Carlsbad, CA, Catálogo nº 12888-100), de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante, como descrito: uma amostra de 250 mg de solo foi pesada em uma balança analítica TC-403 (Denver Instrument Company) e adicionada ao tubo PowerBead de 2 ml; foi agitada em vortex levemente e adicionados 60 µl da solução C1 invertendo o tubo várias vezes; o tubo foi preso ao Adaptador MoBIO Vortex e agitado em vortex por 10 min à velocidade máxima; após esta agitação, uma centrifugação a 10.000 x g por 30 s foi realizada; o sobrenadante (aproximadamente 450 µl) foi transferido para um

novo tubo e então foram adicionados 250 µl da solução C2 e agitado em vortex por 5 s; após essa etapa, incubou-se a 4 °C por 5 min; após o tempo de incubação todas as amostras preparadas como descrito acima foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 1 min e então 600 µl do sobrenadante de cada uma foram transferidos para um novo tubo; foram adicionados 200 µl da solução C3 e agitados por 5 s; após essa etapa, foram incubadas novamente a 4 °C por 5 min. Após o tempo de incubação, uma nova centrifugação a 10.000 x *g* por 1 min foi realizada para cada amostra. Transferiram-se 750 µl do sobrenadante a um novo tubo; adicionando-se 1200 µl da solução C4 e agitado por 5 s. O volume total foi transferido para a coluna (com filtro) contendo o tubo coletor, que vem junto ao Kit, sucessivamente por três vezes coletando 675 µl de cada vez e centrifugando a 10.000x *g* por 1 minuto. A seguir 500 µl da solução C5 foram colocados na coluna e centrifugados a 10.000 x *g* por 30 s; descartado o sobrenadante centrifugou-se novamente o tubo por mais 1 min a 10.000 x *g*; após essa etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 100 µl da solução C6 no centro da coluna; centrifugado a 10.000 x *g* por 30 s e obtendo-se o DNA extraído das amostras.

Para a análise qualitativa do DNA, uma alíquota de 5 µl da suspensão do DNA total obtido, foi adicionada a 3µl de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicose) e submetida à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004). (TSB 20X: para 1L de solução estoque; foram dissolvidos 8 g de NaOH em 600 mL de água destilada; ajustado o pH = 8.0 com Ácido Bórico na forma sólida; completando o volume para 1 L. No momento do uso este era diluído para uso em 1X). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 60 min corado com *Gelred* (Uniscience) e então a imagem foi documentada em um aparelho fotodocumentador de gel (UV Transilluminator Crystal BioGlow Model ZT-21).

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro, modelo NANODROP 2000C (THERMO SCIENTIFIC), adotando-se a relação de 1,0 de densidade ótica a 260 nm (DO_{260}), a concentração do DNA das amostras variou na quantificação pelo espectrômetro, de 20ng.µl⁻¹ a 100 ng.µl⁻¹.

4. Amplificação do gene 16S rRNA para o domínio Bacteria

O DNA extraído e quantificado de cada uma das amostras foi amplificado com os *primers* 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492r (5' ACC TTG TTA CGA CTT 3') do gene 16S rRNA que amplificaram regiões do genoma de tamanho esperado, com aproximadamente 1500 pb. Nas reações de amplificação do gene 16S rRNA, para utilização nas técnicas de T-RFLP e na clonagem dos fragmentos para sequenciamento (biblioteca 16S rRNA) estes mesmos *primers* foram utilizados (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Porém para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP, a extremidade 5' do *primer* 27f foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). Segundo Moeseneder et al. (2001) estas regiões da subunidade menor do rRNA apresentam maior heterogeneidade.

Foram realizadas duas reações de amplificação do gene 16S rRNA uma para cada técnica. A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 µl de tampão para PCR 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4 e 500 mM KCl.); 1,0 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de dNTP 10 mM; 0,25 µl de BSA 1 ng.µl⁻¹; 0,2 µl de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); 0,5 µl de cada *primer* a 5 pmol; 1-5 ng da amostra de DNA metagenômico para técnica T-RFLP; 20 ng da amostra de DNA metagenômico para técnica clonagem dos fragmentos para sequenciamento e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 59°C por 45 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 15 min.

Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology) foi analisada posteriormente em fotodocumentador e quantificada em espectrofotômetro conforme descrito anteriormente.

5. Purificação dos Produtos de PCR

Após a obtenção do produto da PCR foram realizadas as purificações dos produtos da PCR a serem analisados pelas técnicas de T-RFLP e na clonagem dos fragmentos para sequenciamento (biblioteca 16S rRNA). Para isto foi utilizado o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Catálogo nº 28-9034-70), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao produto de PCR 100 µl de *Capture buffer type 2* e a mistura transferida para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a 16.000 x *g* por 30 s. O filtrado foi descartado, na coluna GFX adicionaram-se 500 µl de *Wash buffer type 1* e após a centrifugação a 16.000 x *g* por 30 s, o filtrado foi descartado. A coluna foi transferida para um novo tubo e para a eluição do DNA, foram adicionados 20 µl do *Elution buffer type 4* no centro da membrana. A mistura foi incubada por 1 min à temperatura ambiente e centrifugada a 16.000 x *g* por 1 min para recolher o DNA purificado. Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology) foi analisada posteriormente em fotodocumentador e quantificada em espectrofotômetro conforme descrito anteriormente.

Parte I – Análise das estruturas bacterianas pela técnica de T-RFLP

1. Reação de Restrição dos Produtos de PCR para Análise de T-RFLP

Posteriormente a extração das amostras, amplificação dos produtos da PCR marcados e purificação, foi realizada uma reação de restrição com as endonucleases *HhaI* (GCG[^]C) e *MspI* (C[^]CGG), gerando fragmentos terminais de restrição (T-RFs), essas enzimas apresentam melhores resultados para uso em T-RFLP (MARSH et al., 2000). Nas reações foram utilizados 0,06 µl da endonuclease 10U (Invitrogen); 1,5 µl do Buffer React 10X; 0,15 µl de BSA 1 ng.µl⁻¹; 60 ng do produto de PCR purificado e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para um volume final de 15 µl. As reações de restrição foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied

Biosystems) nas seguintes condições: 37°C por 3 h e 68°C por 10 min para inativação da endonuclease.

2. Precipitação dos Produtos de Digestão

Após a reação de restrição os produtos digeridos foram precipitados para análise de fragmentos em sequenciador automático. Para a precipitação foram adicionados 2 µl de tampão Acetato de Sódio/EDTA e 60 µl de etanol absoluto a 15 µl do produto da digestão. A mistura foi agitada levemente no vórtex e centrifugada a 12.000 x *g* por 15 min, descartando o sobrenadante. Foram adicionados 150 µl de etanol 70% recém-preparado e centrifugou-se a 12.000 x *g* por 5 min. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco em concentrador (Concentrador 5301, Eppendorf) a 45°C por aproximadamente 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a análise dos fragmentos.

3. Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do Gene 16S rRNA de bactéria

A análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi realizada na EMBRAPA Meio Ambiente Jaguariúna-SP, pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental em um sequenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As amostras dos amplicons dos gene 16S rRNA digeridas foram ressuspendidas em HiDi formamida e submetidas a eletroforese em um sequenciador, o padrão de comprimento utilizado foi GeneScanTM – 600LizTM Size Standard (Applied Biosystems).

4. Processamento dos Dados

Após a realização da análise de T-RFLP no sequenciador automático os dados obtidos foram primeiramente analisados pelo programa GenMapper v 4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para a avaliação da qualidade das corridas no sequenciador e uma matriz foi exportada para o programa Excel (Microsoft), onde as planilhas de dados foram organizadas para realização das

análises estatísticas e de riqueza pelos programas Canoco 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e pelo programa Primer5 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido) foi realizada análise de Shannon-Wiener (H') de todas as amostras de T-RFLP. Todas as análises foram realizadas com as duas enzimas *Mspl* e *HhaI*.

As análises dos Componentes Principais foram geradas pelo programa Canoco 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda). A análise de similaridade ANOSIM foi realizada para avaliar a diferença na composição das comunidades e para avaliar a porcentagem de dissimilaridade a análise de SIMPER (ambos os testes calculados com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis) foi realizada utilizando o programa Primer5 (CLARKE, 1993).

Parte II - Análise da diversidade por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

1. Seleção de amostras

Para a construção das bibliotecas do gene 16S rRNA, foram selecionadas amostras DNA de 4 áreas distintas, da camada 0-20 cm. Para comparação das áreas uma amostra da Mata Nativa (MN), duas amostras da Cana Queimada sendo uma com tratamento convencional (CQCN) a outra convencional mais adição de calcário (CQCCAL) e uma amostra da Cana Crua sem palhada com o tratamento convencional (CCCN). As amostras foram escolhidas para as comparações das mudanças do uso da terra, uso agrícola e manejo. No total foram obtidas quatro bibliotecas, para se comparar a diversidade encontrada em cada área.

2. Clonagem dos Produtos de PCR

Após a extração das amostras, amplificação dos produtos da PCR e purificação, foi realizada a clonagem dos produtos da PCR do gene 16S rRNA de Bacteria em vetor *pGEM®-T Easy* (Figura 5), de acordo com as instruções do fabricante do Kit *pGEM®-T Easy Vector* (Promega, Catálogo nº A3600). A reação de ligação do produto de PCR purificado ao vetor foi realizada da

seguinte maneira: 1 µl de T4 DNA Ligase (3U/µl); 5 µl de tampão T4 Ligase 1X; aproximadamente 100 ng do produto de PCR purificado e 54 ng do vetor pGEM®-T. A quantidade necessária em ng do produto de PCR a ser utilizado na clonagem foi realizada considerando a fórmula (Figura 6) abaixo.

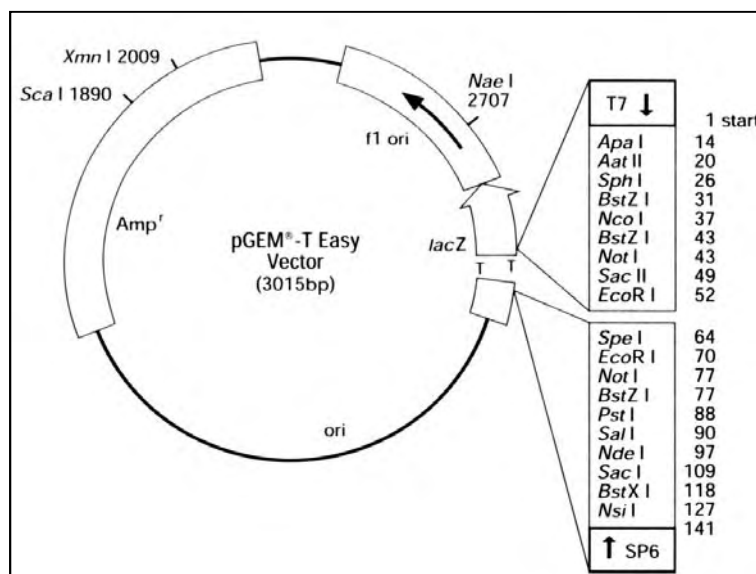


Figura 5. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®)

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{Tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{taxa molar inserto : vetor}$$

Figura 6. Cálculo da quantidade do produto de PCR para ser utilizado na clonagem.

A taxa molar inserto/vetor utilizada foi de 3:1. A reação foi incubada a 4°C durante a noite para a obtenção de uma maior eficiência de ligação.

3. Preparo das Células Competentes de *Escherichia coli*

As células competentes utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA-USP da Dr^a Siu Miu Tsai e previamente preparadas conforme protocolo descrito a seguir. Células competentes de *E. coli* DH5α foram preparadas quimicamente utilizando o método de Cloreto de Cálcio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Células de uma colônia isolada de *E. coli*, crescidas anteriormente em placa de Petri contendo

meio Luria Bertani – LB (1% de Triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de agar), foram inoculadas em 10 ml de meio LB líquido, o qual foi incubado a 37°C por 16 h, sob agitação constante de 200 rpm (New Brunswick Scientific – C24 Incubator Shaker, Edison NJ, USA). Após o crescimento da cultura, 100 µl foi adicionado a 25 ml de meio LB líquido para a reinoculação, mantendo-se o frasco incubado a 37°C por aproximadamente 4 h, sob agitação constante de 200 rpm, até atingir uma absorbância de 0,5 a 600 nm. As células foram transferidas para tubo de 50 ml e incubadas no gelo por 10 min. O tubo foi centrifugado a 3500 rpm, por 15 min a 15°C em uma centrífuga refrigerada (Eppendorf, modelo 5804 R). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1/2 volume de uma solução gelada e esterilizada de CaCl₂/Glicerol (50 mM de CaCl₂ e 10% de glicerol). As células foram incubadas no gelo por 15 min e centrifugadas a 3500 rpm, por 15 min a 15°C. As células foram gentilmente ressuspensas em 1/5 do volume da solução gelada de CaCl₂/Glicerol. Alíquotas de 100 µl foram transferidas para microtubos e armazenadas a -80°C.

4. Transformação de *E. coli*

A transformação das células foi realizada usando protocolo de transformação através de choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) com plasmídeo comercial *pGEM T-Easy* de concentração conhecida. A eficiência foi estimada em 10⁸ transformantes por µg de DNA. O vetor contendo o inserto foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5α através de choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O processo de transformação foi realizado da seguinte maneira: 2 µl do produto de ligação e 50 µl de células competentes foram adicionados em microtubo, sendo misturados gentilmente e incubados no gelo por 30 min. Em seguida, o microtubo foi incubado a 42°C em banho-maria por 50 s e novamente incubado em gelo por mais 2 min. Foram adicionados 450 µl de meio SOC (Solução: 2 g de bacto-triptona, 500 mg de extrato de levedura, 1 mL de NaCl 1 M, 250 mL de KCl, 1 mL de MgCl 2 M, 1 mL de glicose 2 M, completando-se com 100 mL de água filtrada) à temperatura ambiente e incubado por 2 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm.

As células competentes transformadas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de ampicilina, X-Gal e IPTG (todos em concentração final de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). A cultura com as células foi incubada em estufa a 37°C por 16 h e, após este período, as placas foram armazenadas a 4°C para facilitar a visualização e a seleção das colônias azuis/brancas.

5. Seleção dos Clones e Lise do DNA

Apenas as colônias brancas, as quais devem conter vetor/inserto, foram selecionadas para a continuação do trabalho. As colônias foram coletadas com auxílio de palitos estéreis e transferidas para microplaca 96-well, contendo $50 \mu\text{l}$ de TE (Tris 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH8). Para a lise do DNA das células em suspensão, a placa foi submetida a 95°C por 10 min. em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). As placas contendo o DNA extraído foram mantidas a -20°C até posterior utilização.

6. PCR de Inseto

Nas reações de amplificação da região do vetor contendo o inserto do gene 16S rRNA de Bacteria, foram utilizados os *primers* M13f (5' GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A 3') e M13r (5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAG G 3') (HUEY; HALL, 1989). A amplificação foi feita em solução contendo: $3,0 \mu\text{l}$ de tampão para PCR 10X; $1,8 \mu\text{l}$ de MgCl_2 50 mM; $0,6 \mu\text{l}$ de dNTP 10 mM; $0,15 \mu\text{l}$ de Platinum® Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); $1,2 \mu\text{l}$ de cada *primer*; $1 \mu\text{l}$ da amostra de DNA extraído das colônias e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de $30 \mu\text{l}$. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 52°C por 30 s e 72°C por 1 min; e 72°C por 10 min. Uma alíquota de $5 \mu\text{l}$ do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB, utilizando como padrão molecular $2 \mu\text{l}$ de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente fotodocumentado e quantificado em espectrofotômetro.

7. Purificação e PCR de Sequenciamento

Após a verificação da amplificação, os produtos de PCR foram secos em concentrador (Concentrador 5301, Eppendorf) e foram encaminhados à empresa MacroGen localizada em Seul na Coreia do Sul (<http://dna.macrogen.com/eng/>), que realizou a purificação, a reação de sequenciamento e a precipitação das amostras. A reação de sequenciamento foi feita utilizando o *primer* M13f (5' GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A 3') (HUEY; HALL, 1989). O sequenciamento dos clones foi realizado em sequenciador automático, modelo ABI 3730xl *DNA Analyzer* (Applied Biosystems™).

8. Análise das Sequências

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciamento foram analisados no site *Ribosomal Database Project II* (RDP II) versão 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>), para edição e remoção de sequências com baixa qualidade (COLE et al., 2009). O nível de exigência mínima foi de 400 bases com qualidade Phrap acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas), para posteriores análises. A análise comparativa das bibliotecas foi realizada através do programa Library Compare (limiar de confiança de 95%) do site RDP, que possui um sistema de classificação taxonômica (RDP Hierarchy) que segue a proposta do Manual Bergeys (GARRITY; BELL; LIBURUN, 2004) no qual os principais níveis taxonômicos são: Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie.

A comparação da diversidade das sequências foi realizada utilizando o software MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009). Uma matriz de distância foi gerada e as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) considerando-se uma distância evolutiva de 0,03 (97% de similaridade), através do algoritmo de "*furthest neighbor*", onde todas as sequências dentro de cada UTO são no máximo 3 ou 5% distante evolutivamente uma das outras.

Pelo software MOTHUR foram avaliados estimadores de riqueza não-paramétricos como Chao 1 (CHAO, 1987) e ACE (Abundance-based Coverage

Estimator) (CHAO; LEE, 1992), e índices de diversidade como Shannon e Simpson, os quais utilizam diferentes aproximações matemáticas para estimar a diversidade, dando medidas quantitativas da maior ou menor diversidade encontrada nas amostras. Outro método utilizado para estimar a riqueza de UTOs na comunidade, foi o estimador *Jackknife* (COLWELL; CODDINGTON, 1994) baseado na frequência observada de UTOs raras.

Com o software MOTHUR também obtivemos o índice de cobertura estimada (ICE), a análise de cluster com base em 1000 repetições, que foi realizada para comparar a composição das bibliotecas com base na UTOs encontradas nas diferentes amostras, o diagrama de Venn que foi elaborado para comparar as UTOs únicas e compartilhadas entre as bibliotecas e a construção das curvas de rarefação. Essas curvas na maioria das vezes se desenvolvem rapidamente no início, onde as espécies mais comuns são encontradas, e começam a atingir o platô quando apenas espécies mais raras continuam a ser reconhecidas. Por fim, a análise de S-Libshuff (SINGLETON et al., 2001) foi realizada para observar se houve diferenças estatísticas entre as quatro bibliotecas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do solo

As diferenças observadas entre os valores dos atributos químicos dos solos, considerando a proximidade e origem física das amostras estudadas, podem ser atribuídas, inicialmente, a adição dos corretivos no solo como calcário e gesso. Os valores de pH dos solos estudados estiveram entre 4,0 e 6,1 (Tabela 2) sendo esses caracterizados como ácidos. A amostra de solo MN apresentou o pH mais baixo (pH 4.0) quando comparada aos solos sob o cultivo de cana-de-açúcar. Por outro lado as áreas que receberam tratamento com calcário tiveram sua acidez corrigida, apresentando valores de pH mais elevados quando comparados aos outros tratamentos. De maneira geral a calagem favorece a atividade microbiana aumentando o pH, a disponibilidade de nutrientes aos microrganismos (BUNEMANN; SCHWENKE; VAN ZWIETEN,

2006) e contribui com a melhoria da fertilidade do solo e a fixação biológica do N (CANTARELLA; TRIVELIN; VITTI, 2007).

Nos estudos de Silveira et al. (2006) foram realizadas análises de DNA metagenômicos em um Latossolo Vermelho sob o cultivo intensivo de eucalipto e em floresta nativa no Estado de São Paulo - Brasil, os valores de pH do solo de floresta foram mais ácidos quando comparados em relação ao solo cultivado. O pH do solo não pode alterar diretamente a estrutura da comunidade bacteriana, uma vez que um grande número de características dos solos (disponibilidade de nutrientes, solubilidade dos cátions característica do carbono, regime de umidade do solo e salinidade) são direta ou indiretamente relacionados com o pH, porém o pH pode funcionar como uma variável nas condições do solo (LAUBER et al., 2009). Por outro lado, estudos microbiológicos sugerem que a riqueza e a diversidade de espécies são fortemente influenciadas pelo pH (FIERER; JACKSON, 2006; HARTMAN et al., 2008; JESUS et al., 2009).

Quanto ao teor de matéria orgânica (MO) esta foi maior para a área de MN quando comparadas às áreas de CQ e CC. Solos com teores elevados de matéria orgânica tendem a manter a população microbiana mais estável ao longo do ano, o tipo e a quantidade de matéria orgânica no solo influencia fortemente a diversidade funcional nos ecossistemas do solo e a abundância microbiana (DE FEDE et al., 2001; GRAYSTON et al., 2001).

Segundo Ripoli e Ripoli (2004) com a queima da cana-de-açúcar o solo sofre um aquecimento à cerca de 160 a 200°C nas camadas mais superficiais oxidando boa parte da matéria orgânica nessa camada, contribuindo para o processo de erosão, deixando-o exposto ao impacto das chuvas e ocasionando no solo a perda de nutrientes essenciais para desenvolvimento.

Considerando-se as características granulométricas (Tabela 3) das amostras de solo, observa que nas áreas de CC obtivemos valores maiores de teor de argila quando comparado com as outras áreas, sendo esse classificado como de textura média enquanto os outros solos apresentam textura arenosa das áreas de MN, CQ. Em solos onde a prática da queima da palha anterior a colheita ocorre são constatados efeitos imediatos e diretos nas propriedades físicas e químicas do solo, afetando diretamente a atividade microbiana (BLAIR, 2000; ARE et al., 2009;). Atividades agrícolas intensas em solos

arenosos, como aqueles associados ao preparo convencional, são prejudiciais ao meio ambiente, pois tais atividades podem causar perda de M.O, nutrientes e argila e a lixiviação de fertilizantes para as camadas mais profundas (REATTO et al., 2001).

As emissões de CO₂ do solo (Tabela 4) foram superiores na MN ($p < 0,001$), isso certamente está relacionado à presença de vegetação na área onde a respiração das raízes passa a ser um componente adicional da emissão de CO₂. Por outro lado, quando se comparam as áreas com o cultivo de cana-de-açúcar desprovidas de vegetação, nas amostras da CQ e CC é possível verificar que as diferenças nas emissões de CO₂ em cada um dos sistemas de manejo, estão relacionadas com o preparo do solo e aplicação de calcário ou gesso. As taxas maiores de emissão CO₂ do solo observadas nas parcelas de CC com revolvimento do solo (preparo convencional) podem estar relacionadas à presença de palhada sobre a superfície do solo, uma vez que grande quantidade de C é adicionada ao sistema, após as operações de preparo, ficando assim disponível à degradação microbiana. Consequentemente ocorre um aumento na atividade microbiana e nas taxas de emissões. As emissões nas parcelas sem preparo CQSP, CCSP e PCCSP foram as mais baixas em relação às outras parcelas durante todo o período estudado, que sugere que quanto menor o revolvimento do solo pelo preparo convencional, menor a taxa de emissão de CO₂ desses solos.

Nos valores de umidade do solo (% de volume) (Tabela 4), das amostras PCCSP e CCSP indicam que com a remoção da palhada da cana-de-açúcar, houve uma redução da umidade do solo seguido por um aumento nas emissões de CO₂ apresentado na parcela sem preparo (FIGUEIREDO, 2012). Solos sem preparo com cultivo de cana-de-açúcar apresentaram os maiores valores de umidade, por outro lado o restante das amostras não houveram diferenças na umidade. A umidade do solo pode tanto favorecer como inibir a produção de CO₂, o conteúdo de umidade do solo afeta os processos de respiração, alto conteúdo de umidade proporciona ótimas condições para atividade microbiana. A atividade microbiana incrementa o consumo do oxigênio microbiano e a produção e emissão de CO₂ do solo (SILVA-OLAYA, 2010). A umidade do solo é um fator importante que influencia a produção e a difusão de CO₂, incluindo a entrada de oxigênio no solo (REICHSTEIN;

TENHUNEN; ROUPSARD, 2002; XU; BALDOCCHI; TANG, 2004; TANG; BALDOCCHI, 2005

Os resultados das medidas da temperatura do solo (Tabela 4) apresentaram valores semelhantes para todos os sistemas de colheita e manejos estudados durante todo período do experimento, com médias entre 26,4 a 27,9 °C. O valor médio da Mata Nativa foi de 23°C o que pode ser devido à presença de extensa vegetação no local. A temperatura do solo e o regime de umidade são de extrema importância, uma vez que eles influenciam na atividade de decomposição microbiana em escalas milimétrica afetando o ciclo do carbono orgânico (RODRIGO et al., 1997). Um incremento na temperatura do solo acelera a decomposição da matéria orgânica, a oxidação, a atividade microbiana e das raízes, assim como altera os processos de mineralização do C (JABRO et al., 2008; SILVA-OLAYA, 2010).

Parte I – Estrutura das comunidades microbianas

1. Análises dos componentes principais

Os resultados de testes estatísticos aplicados aos resultados da técnica de T-RFLP com as duas enzimas *HhaI* e *MspI* estão apresentados na Tabela 5.

Pela análise de ANOSIM revelou-se diferenças estatísticas significativas entre as populações do solo MN e os solos sob cultivo de cana-de-açúcar, entretanto todos os solos com tal cultivo não apresentaram diferenças significativas entre as comunidades presentes. Na Cana Crua com palhada e sem palhada o teste de ANOSIM mostrou que não há diferenças significativas entre as comunidades microbianas desses solos, com valores de $r=0.0$ e 0.016 ($p<0.05$) para as enzimas *MspI* e *HhaI*, respectivamente, provando que os resultados com ambas endonucleases foram similares, o que confere robustez na análise. Quando o valor de r dá zero, quer dizer que a hipótese é nula, ou seja, não há diferença entre as amostras. As populações do solo da CQ e da CC também não apresentaram diferenças significativas entre as comunidades presentes.

O teste de SIMPER é um teste estatístico que avalia a diferença entre grupos, expressando os resultados em valores percentuais de dissimilaridade,

onde quanto maior esses valores mais diferentes são os dois ambientes, pois o valor indica dissimilaridade. Portanto, comparando os resultados dos dois índices podemos ver que um valor confirma o outro, podemos visualizar que as amostras que apresentaram uma maior dissimilaridade foram MN quando comparada com as amostras que apresentam o cultivo de cana-de-açúcar, e a relação com menor dissimilaridade foram as amostras Cana Crua c/ palhada X Cana Crua s/ palhada com valores baixos de dissimilaridade, ou seja, mais parecidas, o que corrobora os dados do ANOSIM. A amostra de CQ apresentou valores baixos de dissimilaridade com as amostras de CC confirmando valores obtidos pelo ANOSIM.

Tabela 5. Índices de dissimilaridade das estruturas bacterianas pelos testes de ANOSIM e SIMPER obtidos usando a técnicas de T-RFLP.

Ambientes	ANOSIM ^a		SIMPER ^b	
	<i>Mspl</i>	<i>Hhal</i>	<i>Mspl</i>	<i>Hhal</i>
Mata Nativa X Cana Queimada	0,623	0,851	18,97%	40,74%
Mata Nativa X Cana Crua c/ palhada	0,627	0,949	20,11%	44,28%
Mata Nativa X Cana Crua s/ palhada	0,574	0,925	19,14%	42,63%
Cana Queimada X Cana Crua c/ palhada	0,161	0,228	15,22%	17,70%
Cana Queimada X Cana Crua s/ palhada	0,235	0,251	15,15%	17,89%
Cana Crua c/ palhada X Cana Crua s/ palhada	0,016	0,000	13,27%	14,14%

^aANOSIM testa a diferença entre amostras. Valores de “r” são expressos, todos com $p < 0,001$. Valores $> 0,75$ são estatisticamente diferentes; $> 0,5$ possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e $< 0,5$ não apresentam diferença estatística.

^bSIMPER, quanto maior a porcentagem maior a dissimilaridade entre as amostras.

De modo geral, a Análise de Componentes Principais (PCA) das comunidades bacterianas realizada com os dados de T-RFLP revelaram que as amostras foram separadas de forma distinta no gráfico de ordenação (Figura 7. A), formando grupos definidos para cada ambiente analisado; a variabilidade das amostras foi explicada 100% nos dois primeiros eixos plotados. As

amostras da MN foram agrupadas mais próximas entre si mostrando uma homogeneidade entre as réplicas. Isto pode ser explicado pelo fato de tratar-se de um ambiente um pouco mais equilibrado e sem ação antropogênica direta (Figura 7. A).

Pode-se notar também que as amostras de Cana Crua com palhada e sem palhada se agrupam na PCA de forma mais próximas entre si. A CQ apresenta-se distribuída entre a CC, confirmando os dados de ANOSIM e SIMPER, onde a MN difere dos outros ambientes. Portanto, esta metodologia mostrou que o solo da área MN detém grupos bacterianos mais distintos daqueles encontrados nas outras áreas estudadas.

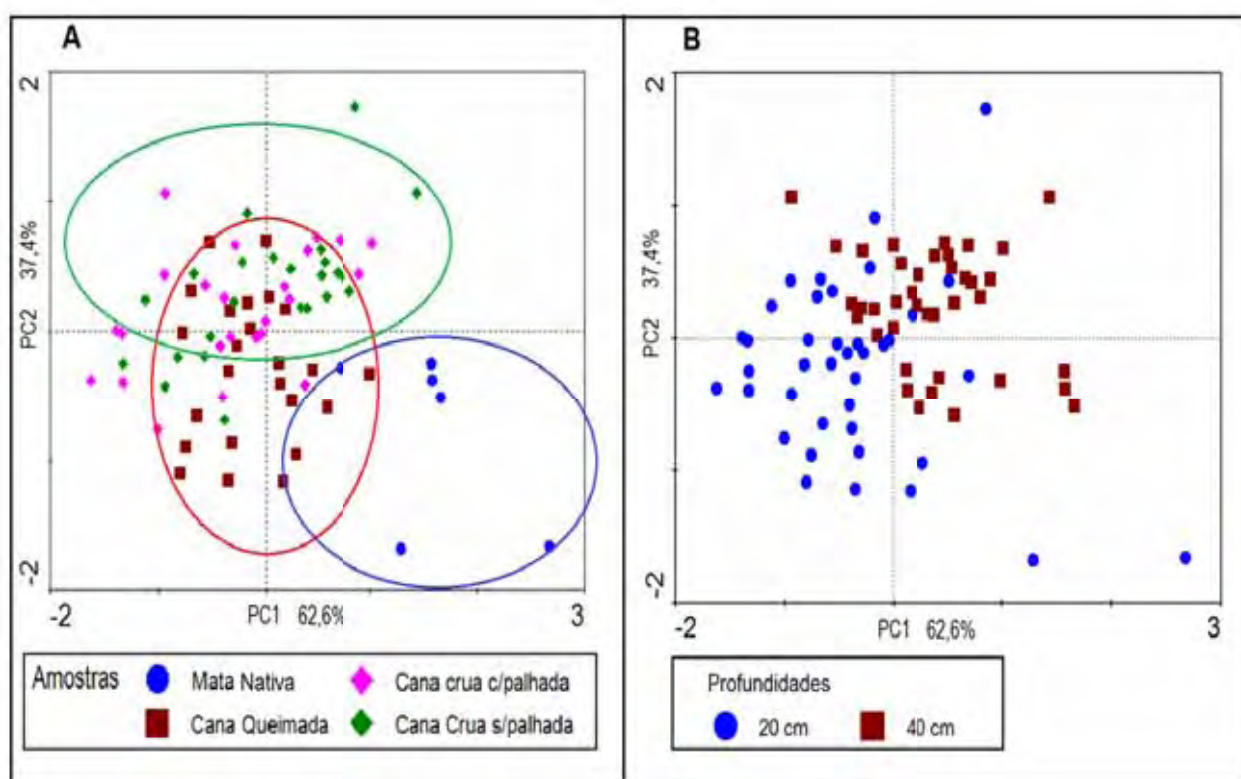


Figura 7. Análises de Componentes Principais das comunidades microbianas dos solos estudados com todas as amostras incluindo triplicatas e nas duas profundidades. (A) PCA da estrutura da comunidade de bactérias determinada por T-RFLP nas áreas estudadas. (B) PCA da estrutura da comunidade de bactérias em relação à profundidade do solo.

Quando comparamos as análises dos componentes principais das diferentes áreas estudadas e a da profundidade do solo (Figura 7 A e B), com os diferentes tratamentos nas áreas de cana-de-açúcar (Figura 8 A e B) as

amostras analisadas quanto tratamentos (Figura 8 A e B) apresentam-se distribuídas de forma mais dispersa, sugerindo assim que os tratamentos tem uma menor influência na diversidade das estruturas bacterianas. Comparando as duas áreas é possível notar que as amostras da CC apresentaram certo nível de semelhança entre tratamentos maior que na CQ onde as amostras estão mais dispersas (Figura 8 A e B). Essa diferença estrutural de comunidades microbianas pode estar relacionada com a ocorrência da queima da cana, que afeta gravemente a atividade biológica do solo, diminuindo a matéria orgânica. Assim gerando uma dispersão maior das estruturas bacterianas nas amostras de CQ quando comparado com as amostras de CC. Os aspectos físico-químicos e particularmente a textura dos solos pode afetar a dinâmica de distribuição de macro e micro nutrientes e a manutenção da estrutura e diversidade microbiana.

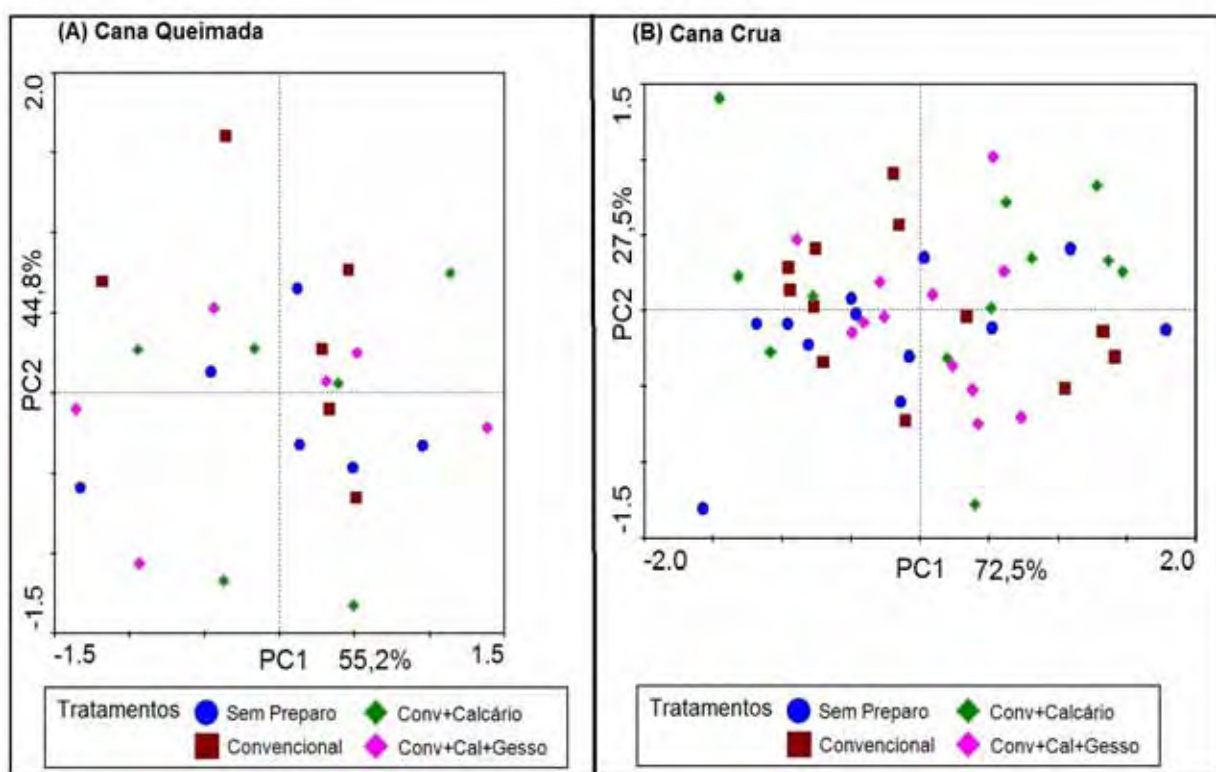


Figura 8. Análises de Componentes Principais com os diferentes tratamentos nas áreas de cana-de-açúcar, realizado com as triplicatas e nas duas profundidades das amostras.

O índice de Shannon-Wiener (H') indica a diversidade de uma comunidade baseada na distribuição e no número de espécies. O índice foi

calculado com os resultados do T-RFLP e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (SAS, 1996) obtendo-se F significativo ao nível de 5%. A diversidade estimada pelo índice de Shannon (H') não apresentou diferença estatística entre as amostras pelo teste de Tukey (Tabela 6): MN 20 cm e 40 cm; CQSP 20 cm e 40cm; CQCN 20 cm e 40 cm; PCCSP 20 cm e 40 cm; PCCNCAL 20 cm e 40 cm; CCNCAL 20 cm e 40 cm; CCNCG 20 cm e 40 cm, nas demais amostras os valores são diferentes entre si. Essa diferença entre as demais amostras pode ser explicada devido à diferença das estruturas das comunidades em função da profundidade do solo amostrado, pela análise dos componentes principais estes dados podem ser confirmados, onde as amostras se apresentam mais agrupadas conforme a profundidade.

Quanto maior o índice de Shannon, maior a diversidade, os índices de diversidade de Shannon revelaram as maiores diversidades nas amostras CQSP 40 cm e CQCN 40 cm e as menores diversidades nas amostras PCCCN 20 cm e PCCNCG 20 cm. Na maior profundidade as ações de manejo do solo podem afetar a comunidades microbianas em uma escala menor que aquela observada na porção superficial 0-20 cm. Quanto à comparação na diversidade de amostras da MN e CQ, deve-se observar que as amostras de MN foram coletadas na periferia da mesma, em pontos não muito distantes da área de cultivo.

Tabela 6. Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') das amostras de T-RFLP

Amostras	Shannon	Letras	Amostras	Shannon	Letras
MN 20 cm	4,335	a	CCSP 40 cm	4,223	a
MN 40 cm	4,386	a	PCCCN 20 cm	4,098	b
CQSP 20 cm	4,306	a	PCCCN 40 cm	4,110	ab
CQSP 40 cm	4,437	a	CCCN 20 cm	4,166	ab
CQCN 20 cm	4,297	a	CCCN 40 cm	4,341	a
CQCN 40 cm	4,420	a	PCCNCAL 20 cm	4,232	ab
CQCCAL 20 cm	4,289	a	PCCNCAL 40 cm	4,188	ab
CQCCAL 40 cm	4,286	ab	CCNCAL 20 cm	4,191	ab
CQCCG 20 cm	4,299	ab	CCNCAL 40 cm	4,300	ab
CQCCG 40 cm	4,272	a	PCCNCG 20 cm	4,067	b
PCCSP 20 cm	4,213	a	PCCNCG 40 cm	4,207	a

PCCSP 40 cm	4,326	a	CCNCG 20 cm	4,253	ab
CCSP 20 cm	4,128	b	CCNCG 40 cm	4,310	ab

Comparação entre as médias de Shannon realizada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si e letras diferentes indicam que as amostras se diferenciam entre si.

2. Relação das Comunidades Microbianas com os Atributos dos Solos

Os atributos químicos e físicos do solo podem estar correlacionados com a variação das comunidades estudadas (FIERER e JACKSON, 2006; HARTMAN et al., 2008; JESUS et al., 2009). Para avaliar a relação das comunidades microbianas estudadas com os atributos físico-químicos do solo e a emissão de CO_2 nas áreas estudadas foi realizada a análise de redundância (RDA) (Figura 9). Pela RDA é possível correlacionar a estruturas microbianas com o ambiente por somas ponderadas das pontuações de ambos. Assim é possível determinar quais fatores ambientais são mais significativos para explicar a variação na composição da comunidade microbiana (RAMETTE, 2007).

Os resultados das análises químicas do solo (Tabela 2) mostram que as áreas são diferentes entre si. A área de cana queimada (CQ) apresentou maiores teores de fósforo (P), potássio (K) e as áreas que tiveram a correção com calcário maiores teores magnésio (Mg) e menores valores de matéria orgânica (M.O). Já a área cana crua (CC) apresentou valores de M.O maiores que na área queimada e menores valores para P e K. No trabalho de Razafimbelo et al. (2006) realizado no município de Pradópolis estado de São Paulo, foi avaliando em um solo do tipo Latossolo Vermelho, áreas de cana-de-açúcar com 6 anos de cultivo com e sem queima, obtiveram também o aumento dos teores de matéria orgânica em áreas sobre o manejo de cana crua. A área de MN apresentou altos teores de M.O e H+Al e menor valor de pH.

A análise de Redundância (RDA) foi realizada com as amostras de 20 cm de profundidade foram avaliadas. A análise foi realizada entre a média das

triplicatas dos dados de T-RFLP de cada amostra e os atributos químico-físicos dos solos.

Nos resultados da análise de redundância (Figura 9) foi apresentado a presença de agrupamentos distintos para os três ambientes estudados, onde as amostras de MN apresentam valores maiores de M.O, H+Al e areia grossa. As amostras de solo de CQ estão mais correlacionadas com K, Mg, SB, Ca, Silte, V e pH um pouco mais ácido. Quando analisamos as emissões de CO₂ é possível notar que ela está mais relacionada com a CC, embora exista uma correlação com a CQ. As amostras de CC estão também correlacionadas com argila e areia fina. Os vetores referentes aos demais parâmetros estão no sentido oposto, o que indica que a CC tem menores valores dos outros fatores. Estas considerações foram realizadas quando não se colocou a emissão maior do CO₂ obtida na MN. Deve-se ressaltar que no ambiente MN as emissões são resultantes do conjunto solo/planta, enquanto que nos solos cultivados com cana considera-se apenas o solo sem a cobertura vegetal. Os valores estatísticos gerados pela RDA revelam quais variáveis tem maior contribuição com a variabilidade dos dados. As variáveis que foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$) são: K, H+Al e M.O com valores 0,002; 0,026; 0,042 respectivamente. Indicando que essas variáveis são as que mais se correlacionaram com a variação das amostras.

No trabalho de Panosso et al. (2011) foi caracterizado a variabilidade espacial e temporal da emissão de CO₂ de um solo Latossolo Vermelho com cultivo de cana-de-açúcar sobre os sistemas de manejo CQ e CC, no nordeste do Estado de São Paulo e sua relação com as propriedades físicas e químicas, foi observado na correlação das variáveis do solo com os componentes principais, que a área de cana crua apresentava uma correlação maior para o teor de argila, e na área de cana queimada uma correlação com fósforo disponível (P) e soma de bases (SB). Esses resultados são condizentes com os obtidos no presente trabalho.

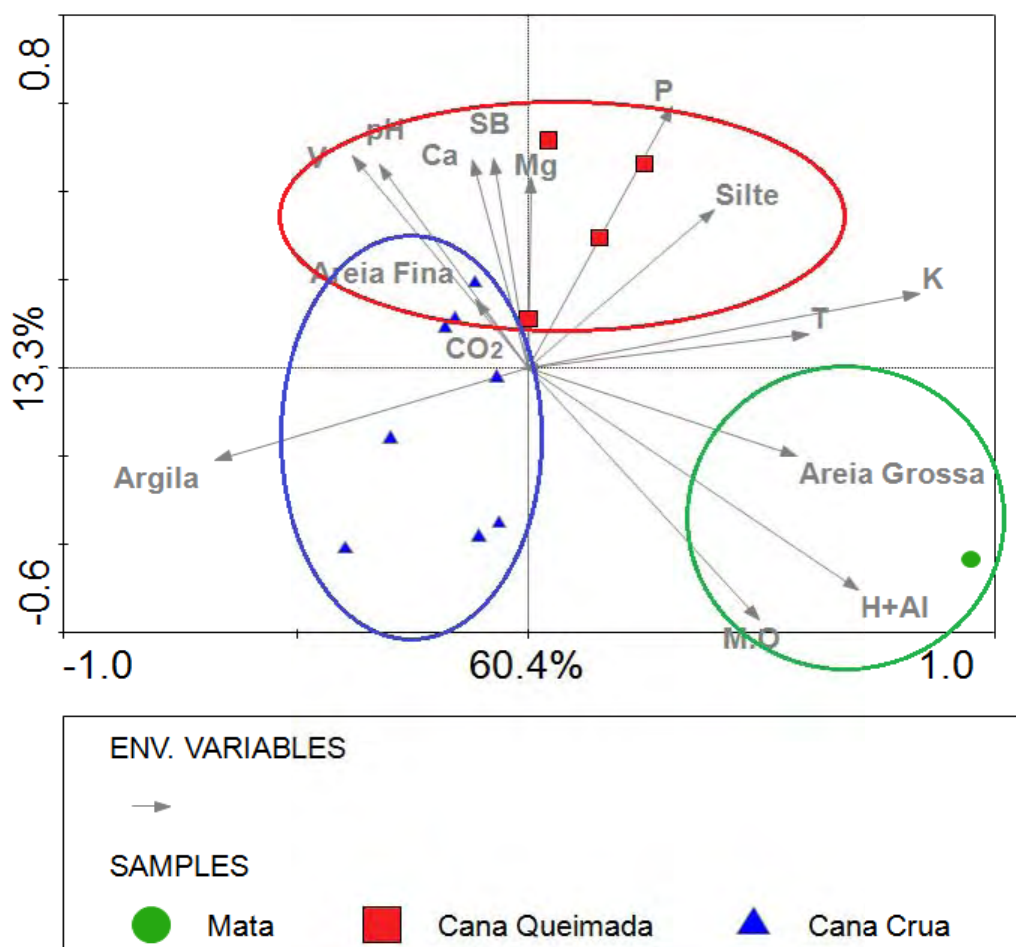


Figura 9 - Análise de Redundância baseada nos dados do T-RFLP com elementos dos solos.

3. Análise de Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais

Os resultados das análises por T-RFLP permitiram avaliar a riqueza de Unidade Taxonômica Operacional (UTO) das diferentes amostras de solo, onde para cada T-RF encontrado no perfil de uma comunidade, foi considerada uma UTO. Como os experimentos foram realizados em triplicatas, se um pico de fluorescência estivesse presente em pelo menos uma das triplicatas, esse T-RF seria considerado como presente no ambiente, minimizando, assim, o efeito de organismos dominantes (MENDES, 2009).

A Figura 10 mostra os gráficos de riqueza de UTOs das comunidades bacterianas. As amostras que apresentaram maior riqueza de UTOs foram a CQ, CC. Para as amostras de CQ, o número de UTOs variou entre 182 e 216,

nas amostras de CC variou entre 165 e 202 e para as amostras de MN variou entre 141 e 149.

A diferença da riqueza de UTOs na área de CQ não foi grande quando comparada com a riqueza na área de CC, mas quando comparada a MN apresentou uma diferença maior. Supõe-se que essa diferença entre a riqueza de UTOs dos grupos, possa ser devido ao uso dos diferentes tratamentos do solo nas áreas com cultivo de cana-de-açúcar, por exemplo, as arações utilizadas no preparo do solo, podem causar perturbações para as comunidades microbianas do solo enquanto as comunidades das áreas da MN ficam mais conservadas.

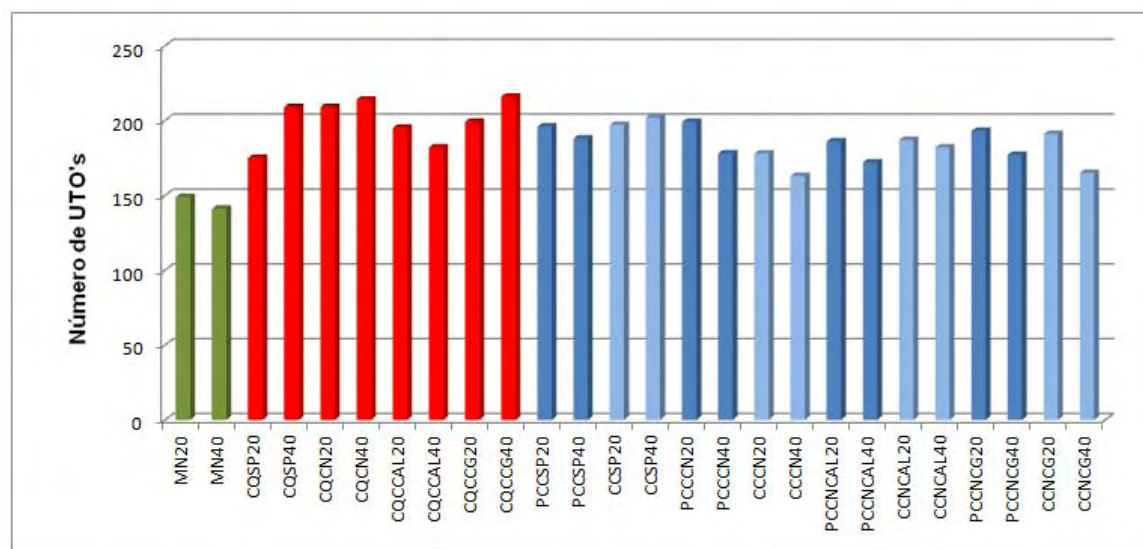


Figura 10 - Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectadas com as técnicas de T-RFLP. Valor das UTOs de cada amostra foi realizado com a média das amostras triplicatas para as duas profundidades (20 cm e 40 cm).

Parte II - Sequenciamento parcial do Gene 16S rRNA

1. Análise dos dados

O objetivo da construção das bibliotecas do gene 16S rRNA foi comparar as possíveis diferenças das comunidades bacterianas presentes nos solos:

- a) solo de Mata Nativa 20 cm (MN);
- b) solo de Cana Queimada convencional 20 cm (CCCN);
- c) solo de Cana Queimada convencional mais calcário 20 cm (CQCCAL);
- d) solo de Cana Crua convencional 20 cm (CQCN).

As quatro amostras selecionadas nos solo acima especificado foram amplificadas com os *primers* específicos para o gene 16S rRNA. Duzentos e oitenta e oito clones transformantes de cada uma das amostras foram sequenciados totalizando 1152 entre as quatro bibliotecas.

As sequências obtidas foram submetidas a análise no site do RDP, obtendo-se 261, 260, 234 e 229 sequências, para o estudo da diversidade bacteriana nas bibliotecas: MN, CQCN, CQCCAL e CCCN respectivamente. As sequências foram alinhadas pelo site do RDP e analisadas pelo software MOTHUR. Obteve-se 949 sequências distribuídas entre as bibliotecas das amostras de solo estudadas. O tamanho mínimo das sequências dos incertos com qualidade Phred acima de 20 foi de 400 pares de bases, o que possibilitou a utilização de 252, 254, 226 e 217 sequências com qualidade para o estudo das bibliotecas MN, CQCN, CQCCAL e CCCN, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Riqueza de UTOs e índices de diversidade calculados a partir das bibliotecas de 16S rRNA.

Bibliotecas	NS	NU	ICE	<u>Estimativas de Riqueza de OTUs</u>			<u>Índices de Diversidade</u>	
				ACE	Chao1	Jackknife	Simpson	Shannon
MN	252	117	91,6%	182,52	151,07	171,00	0,0127	4,46
CQCN	254	185	71,2%	1138,58	463,08	497,00	0,0045	5,06
CQCCAL	226	173	58,8%	477,57	420,02	455,40	0,0028	5,05
CCCN	217	166	64,9%	401,05	358,38	381,10	0,0027	5,02

NS – número de sequencias; NU – número de UTOs determinado pelo programa MOTHUR; ICE- Índice de cobertura estimada.

2. Análise das comunidades microbianas dos solos baseadas em UTOs

Frequentemente a diversidade e a estrutura de comunidades microbianas são analisadas em função da ocorrência de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) (SCHLOSS et al., 2009). As sequências foram analisadas pelo software MOTHUR, considerando-se uma distância evolutiva de 0,03 através do algoritmo de *furthest neighbor*.

O número de UTOs (NU) encontradas na biblioteca variou desde 117 a 185 para MN e CQCN, respectivamente, sendo tais valores na biblioteca CQCCAL de 173 e CCCN de 166 (Tabela 7). Para a verificação quanto às diferenças entre as bibliotecas, foram realizadas análises estatísticas usando o programa S-Libshuff (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004). Através deste programa as quatro bibliotecas foram comparadas revelando que essas populações são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$), sugerindo assim que a ação dos diferentes tratamentos ou as características de cada uma das áreas estudadas influencia as comunidades bacterianas presentes.

Como um dos tratamentos envolveu a modificação do pH pela adição de calcário na amostra CQCCAL, tem-se uma constatação de que os resultados recentemente encontrados (FIERER; JACKSON, 2006; HARTMAN et al., 2008; JESUS et al., 2009) confirmam que a riqueza e a diversidade de espécies são fortemente influenciadas pelo pH. Lauber et al. (2009) afirma que apenas o pH do solo não teria influência nas comunidades uma vez que um grande número de características dos solos (disponibilidade de nutrientes, solubilidade dos cátions característica do carbono, regime de umidade do solo e salinidade) são direta ou indiretamente relacionados com o pH e não podem alterar diretamente a estrutura da comunidade bacteriana, porém o pH pode funcionar como uma variável que fornece uma integração nas condições do solo. Isto se confirma pela análise dos resultados obtidos com os outros tratamentos realizados onde se observou uma diferença significativa entre as comunidades bacterianas influenciando nas estruturas destas comunidades.

O software MOTHUR permitiu determinar o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), e esse resultado foi utilizado no cálculo do índice de cobertura estimada (ICE) e também para a construção da curva de rarefação (3% distância evolutiva). O ICE das bibliotecas de clones de genes

16S rRNA (Tabela 7) indica qual a porcentagem da diversidade coberta pelas sequências. A amostra MN apresentou uma grande cobertura, com 91,6%, seguida das bibliotecas CQCN, CCCN e CQCCAL.

O desenho de curvas de rarefação é uma forma de saber se a amostragem foi suficiente para revelar a diversidade total de uma comunidade (ROESCH, et al., 2007). A riqueza das UTOs em cada biblioteca estudada foi avaliada através de curvas de rarefação, esta metodologia tem sido considerada uma solução para os índices de diversidade dependentes do tamanho da amostra (HUGHES et al., 2001). A Figura 11 apresenta que a amostra de solo da MN está próxima de alcançar sua assíntota na curva de rarefação, indicando que o esforço amostral para a construção das bibliotecas foi representativo. Por outro lado as amostras das áreas cultivadas com cana não atingiram tal estabilização indicando que o número de sequências 16S rRNA não representou adequadamente a riqueza das comunidades bacterianas havendo assim necessidade de mais análises para se confirmar a real composição da populações nessas áreas. Mesmo que as curvas de rarefação dos solos sob plantio de cana não tenham atingido um nível de estabilidade, tais resultados revelaram uma diferença na riqueza de filotipos entre suas comunidades bacterianas, diferenciando-as, de modo que as bibliotecas CQCN, CQCNAL e CCCN revelaram maior riqueza de UTOs quando comparadas com a biblioteca MN (Tabela 7 e Figura 11), evidenciando a ocorrência de comunidades distintas quanto aos valores de riqueza e diversidade, considerando-se principalmente alterações causadas pelo revolvimento e conseqüente oxigenação do solo.

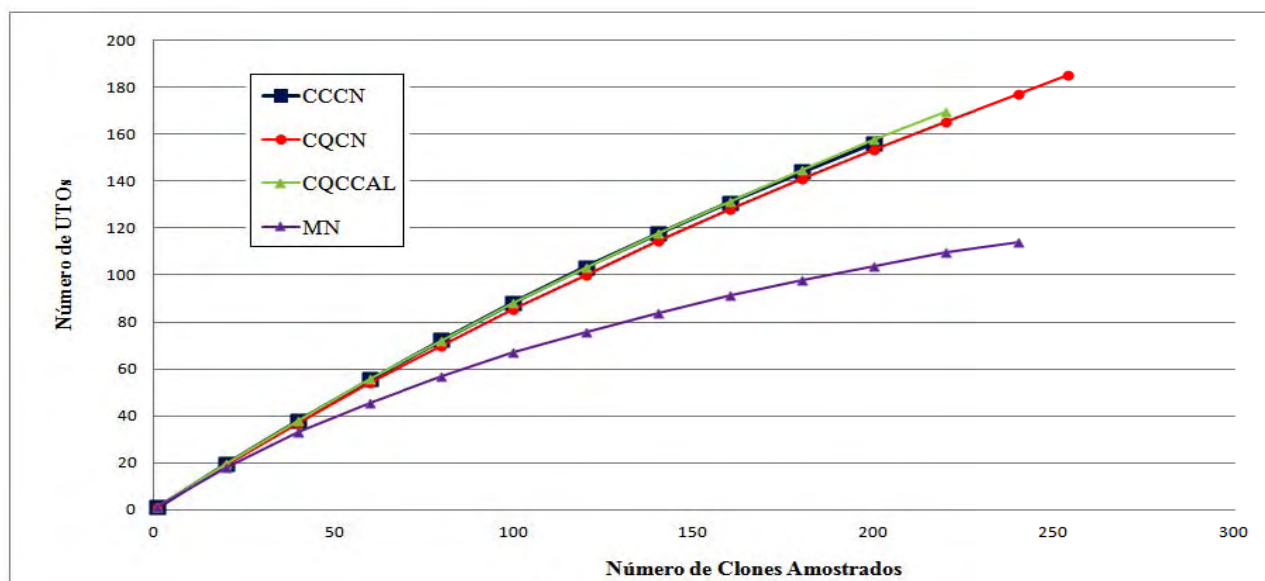


Figura 11. Curvas de rarefação calculada com distância evolutiva 0,03 para as sequências obtidas para as bibliotecas de gene 16S rRNA.

A riqueza de UTOs nas bibliotecas do gene 16S rRNA de diferentes amostras de solo foi verificada por meio do método de rarefação ao nível de 97% de similaridade e pelos métodos também não-paramétricos de estimativa ACE (CHAO; MA; YANG, 1993) CHAO1 (CHAO, 1984 e 1987), capazes de promover estimativas que variam com o número de sequências, e pelo estimador Jackknife seu cálculo foi estabelecido com base na frequência de UTOs únicas. Os valores de estimativa de riqueza estão apresentados na Tabela 7, juntamente com as medidas de heterogeneidade da população microbiana calculadas pela função de Shannon-Wiener e pelo índice de Simpson.

O índice de CHAO1 usa o número de UTOs com uma ou duas sequências para estimar o número de espécies faltantes (CHAO, 1984). No índice de riqueza de espécies ACE as sequências são agrupadas em raras e abundantes de acordo com sua frequência de observação. O algoritmo ACE utiliza as frequências obtidas do banco de dados metagenômico, baseado nas sequências das espécies < 10 ou baixo número de amostras para estimar riquezas de diversidade de espécies (HUGHES et al., 2001).

Análise das comunidades microbianas dos solos baseadas em UTOs pelos estimadores de riqueza ACE, CHAO1 e Jackknife (Tabela 7) retratam numericamente a riqueza de UTOs nas bibliotecas mostradas pela curva de

rarefação, onde a maior riqueza em UTOs foi nas amostras de solo cultivadas com cana-de-açúcar. Por outro lado, os valores obtidos com os índices de diversidade de Shannon e Simpson revelaram uma diversidade menor nas amostras de solo da MN quando comparados com as amostras de solo das áreas cultivadas com cana. Segundo Torsvik et al. (1998), a diversidade de espécies consiste de dois componentes, riqueza e equitabilidade de espécies. Normalmente sequências com similaridade >97% são consideradas da mesma espécie, >95%, do mesmo gênero e >80%, do mesmo filo (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Comparando os resultados das bibliotecas com os dados obtidos pela a técnica de T-RFLP, é possível notar que nas duas técnicas as amostras com CQ foram as que apresentaram os maiores valores de diversidade pelo índice de *Shannon* e valores maiores de riqueza no número de UTOs obtidas, em relação as outras amostras das áreas de MN e CC. Do mesmo modo, os valores obtidos com os métodos não-paramétricos *ACE*, *CHAO1* e *Jackknife* para a estimativa de riqueza de UTOs revelaram uma interpretação semelhante à obtida com os índices de diversidade.

O diagrama de Veen (FAUTH et al., 1996) foi construído para verificar as intersecções e particularidades entre os ambientes, identificando o número de UTOs únicas e compartilhadas entre as áreas estudadas. Através da análise dos diagramas de Venn (Figura 12), foi possível notar uma maior riqueza de UTOs na biblioteca CQCN, que apresentou 96 UTOs únicas e 48% compartilhadas, a amostra MN é a que teve menor riqueza de UTOs sendo 23 únicas e 80% compartilhadas.

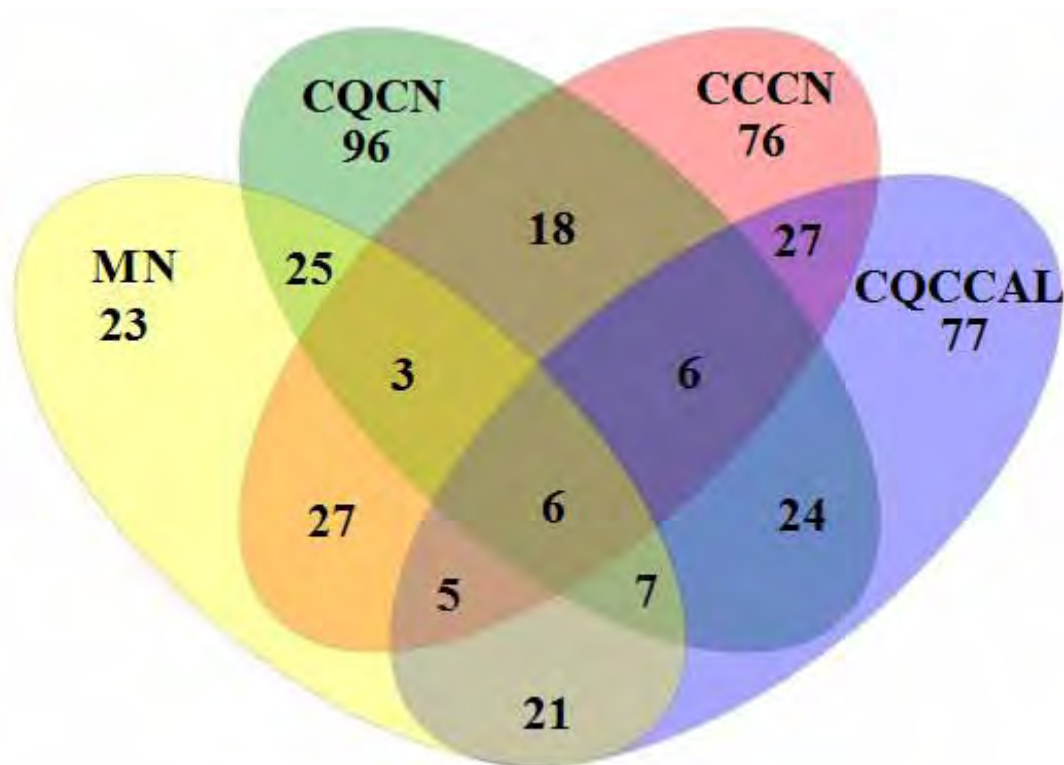


Figura 12. Diagrama de Venn representando o número de UTOs identificados pelo software MOTHUR nas diferentes áreas estudadas.

No trabalho de Upchurch et al. (2008) os índices de diversidade no solo agrícola foram superiores aos índices de solo de floresta. Algumas explicações para o aumento observado na diversidade em solos agrícolas seriam: 1) a variação sazonal na comunidade de plantas de lavoura pode criar um ambiente mais dinâmico e portanto maior diversidade na comunidade bacteriana; 2) a área cultivada está mais exposta do que a floresta. Assim, bactérias transmitidas pelo vento ou por animais podem ser uma ocorrência comum; 3) o preparo pode romper a estrutura da comunidade existente e aumentar a probabilidade de sucesso da imigração na vizinhança; 4) plantas daninhas comuns em cultivos também poderiam influenciar. Mas, no caso dos solos cultivados com cana-de-açúcar isto não influenciaria em virtude do manejo empregado que impede a propagação de plantas daninhas. Nos estudos de Silveira et al. (2006) foram realizadas análises de DNA metagenômicos em um solo sob o cultivo de eucalipto e de um solo de floresta nativa também no Estado de São Paulo - Brasil, os índices de diversidade foram maiores nas áreas com cultivo de eucalipto com predominância do filo *Acidobacteria*.

As amostras CQCCAL e CCCN compartilham 55% e 54%, respectivamente, de suas UTOs com as outras bibliotecas. A análise de sobreposição de UTOs, através do diagrama de Venn, mostra que somente 6 UTOs foram compartilhadas entre as quatro bibliotecas, e entre as bibliotecas de solos com plantio de cana 6 UTOs foram comuns. Quando comparamos uma biblioteca com a outra, verificamos que as amostras que menos compartilham UTOs foram a CCCN a qual compartilha apenas 18 UTOs únicas com a amostra CQCN. Por outro lado esse mesmo solo CCCN compartilha 27 OTUs com o solo da MN. Esses resultados sugerem interferência do sistema de colheita com queima na população bacteriana do solo.

Pela análise de agrupamento das bibliotecas com base nas UTOs encontradas nas diferentes amostras (Figura 13), pode-se notar que as comunidades bacterianas das áreas MN comparadas com CCCN foram mais similares entre si do que com as outras amostras, e a biblioteca de solo da CQCN que se apresentou mais distinta das outras amostras avaliadas nesse trabalho.

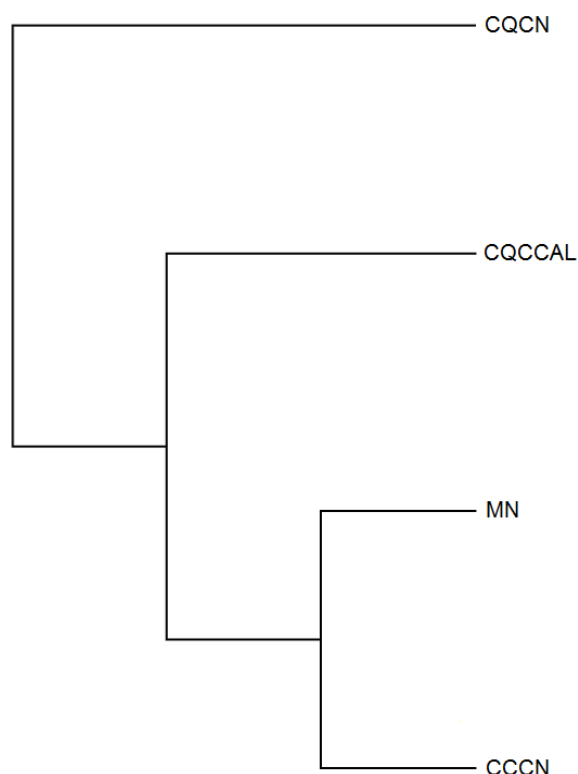


Figura 13. Análise de agrupamento das sequências bibliotecas de clones do gene 16S rRNA nas áreas de solo estudados, realizado pelo programa MOTUR . As UTOs foram definidas com similaridade de 97%.

3. Análise da Diversidade das Comunidades

Com a finalidade de revelar quais filos e classes compõem a comunidade bacteriana nos ambientes estudados, as sequências de cada biblioteca foram classificadas através da ferramenta de classificação do Ribosomal Database Project II (*The Classifier* <http://rdp.cme.msu.edu/classifier>). A confiabilidade desse programa apresenta os mais altos níveis taxonômicos. Os resultados das comparações obtidos em nível de filo são os mais confiáveis do que aqueles obtidos em qualquer outro nível (CANNAPAN, 2007).

Através da classificação no RDP com as 949 sequências, observou-se a presença de 12 filos na comunidade bacteriana dos solos: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*. (Figura 14). Dini-Andreote et al. (2010) avaliaram a composição das comunidades bacterianas em um solo sob cultivo de cana, na região de Piracicaba estado de São Paulo, as amostras de solo foram coletadas durante três estágios de crescimento das plantas, obtiveram os filos: *Proteobactéria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria*, sendo os representantes mais dominantes. E os filos menos frequentes foram: *Chloroflexi*, *Thermomicrobia*, *Nitrospira*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* e *Gemmatimonadetes*.

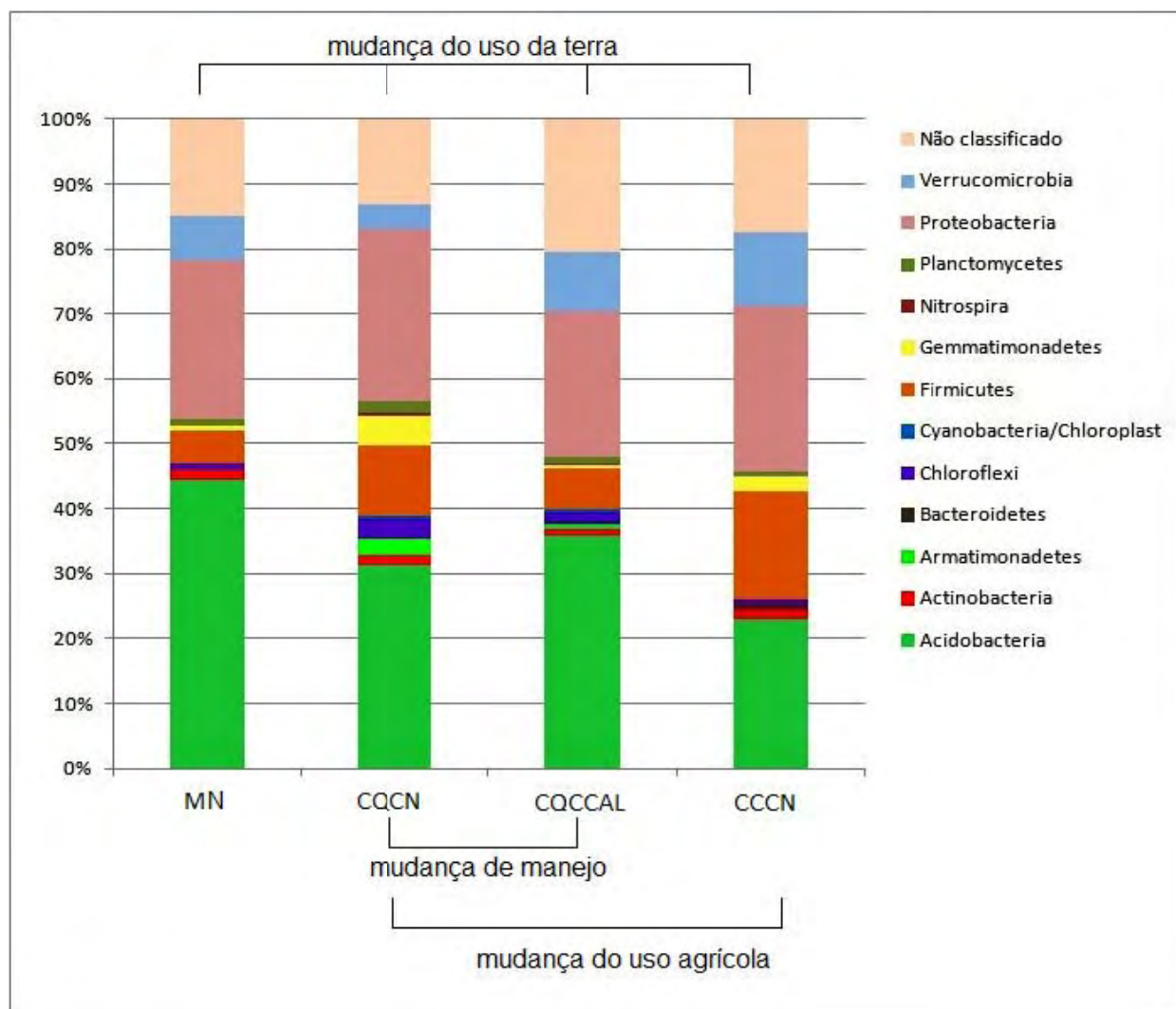


Figura 14. Composição dos diferentes filos baseados na classificação das seqüências parciais do gene 16S rRNA usando a ferramenta *Classifier* do banco de dados RDP-II.

Conforme Garrity, Bell e Lliburun (2004) o domínio *Bacteria*, é composto de 25 filos. Alguns destes filos consistem em uma única ou algumas poucas espécies enquanto outros filos como: *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* incluem milhares de espécies, as quais correspondem a 90-95% de todas as espécies de bactérias conhecidas (NUNES, 2006). As acidobactérias e as protobactérias foram os organismos mais abundantes em todas as bibliotecas estudadas. O filo *Acidobacteria* foi predominante nas bibliotecas MN, CQCN e CQCCAL com valores de 44,4%, 31,2% e 35,9% respectivamente, enquanto na biblioteca CCCN observou-se a presença de

apenas 23,1% de organismos desse filo e os subgrupos Gp1 e Gp2 foram os mais frequentes nas quatro amostras.

No trabalho de Bruce et al. (2010), por meio de bibliotecas de clones do gene 16S rRNA em solos de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro - Brasil, revelou-se que os grupos mais frequentes no solo pertenciam ao filó: *Acidobacteria* (29 - 54%) e *Proteobacteria* (16-38%). Dentre os organismos do filo *Acidobacteria* os subgrupos Gp1 e Gp2 foram os mais frequentes, representando mais de 70% das sequências. Segundo Dunbar et al. (2002) a frequência do filo *Acidobacteria* nos solos oscilou em valores de 20% a 60% dependendo das condições do solo, portanto, os valores obtidos nesse trabalho foram condizentes com a literatura.

A maioria das sequências dos organismos que compõem o filo *Acidobacteria* tem origem de amostras ambientais amplamente distribuídas pelo planeta. Este filo é geralmente encontrado abundantemente em análises do gene 16S rRNA de amostras ambientais marinhas, nos mais diversos tipos de solo, animais, aerossóis e fontes termais (BARNES et al., 2007). Embora em muitos solos o filo das acidobactérias represente o mais abundante, o conhecimento sobre sua diversidade, distribuição e função nos solos ainda é bastante incompleto (KIELAK et al., 2009). As acidobactérias são metabolicamente versáteis, tendo a capacidade de degradar compostos de celulose e outros comumente encontrados em solos de floresta (WARD et al., 2009).

Neste trabalho foram identificados no filo *Acidobacteria* onze subgrupos, os subgrupos Gp1 e Gp2 os mais frequentes (Tabela 8). Foi observado que o subgrupo Gp1 prevaleceu com valores de 41,4% na MN e de 43,4% na CCCN, já o subgrupo Gp2 mostrou valores de 39,5% na CQCN e com 37,3% na CQCCAL . O filo *Acidobacteria* contém 26 subgrupos de similaridade de sequência de genes rRNA, rotulados de 1 a 26 (BARNES et al., 2007). Atualmente o filo possui quatro espécies cultiváveis conhecidas: *Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida* e *Geotrix fermentans* e *Terriglobus roseus* (HUGENHOLTZ, 1998; KOCH et al., 2008). No trabalho de Jones et al. (2009) eles coletaram uma ampla gama de solos todos recolhidos nas Américas do Norte e do Sul, e notaram que os subgrupos mais abundantes

foram Gp1, Gp2, Gp3, Gp4 e Gp6 em todos os solos estudados. Esses resultados corroboram com subgrupos encontrados nesse trabalho.

Tabela 8. Distribuição dos organismos, ao nível taxonômico de classes dentro do filo *Acidobacteria*.

Classes	MN	CQCN	CQCCAL	CCCN
Acidobacteria Gp1	41,40%	13,60%	19,00%	43,40%
Acidobacteria Gp2	31,90%	39,50%	36,90%	24,50%
Acidobacteria Gp3	16,40%	13,60%	9,50%	9,40%
Acidobacteria Gp4	-	9,90%	8,30%	1,90%
Acidobacteria Gp5	2,60%	1,20%	3,60%	7,50%
Acidobacteria Gp6	4,30%	9,90%	13,10%	9,40%
Acidobacteria Gp7	0,90%	6,20%	3,60%	3,80%
Acidobacteria Gp13	-	4,90%	1,20%	-
Acidobacteria Gp15	0,90%	-	-	-
Acidobacteria Gp17	-	-	1,20%	-
Acidobacteria Gp18	-	-	1,20%	-
Não classificado	1,70%	1,20%	2,40%	-

(-) subgrupos não encontrados.

Alguns estudos realizados com membros deste filo *Acidobacteria* sugerem que estes microrganismos podem ser fatores importantes, e a chave dos processos em diversos ecossistemas, particularmente em comunidades de solo (HUGENHOLTZ et. al, 1998; DUNBAR et al., 2002; KIELAK et al., 2010).

O filo *Acidobacteria* é de interesse ecológico devido a sua elevada abundância em solos no total das comunidades de bactérias, juntamente como resposta ao pH, carbono, manejo do solo e elevada taxa de dióxido de carbono atmosférico um dos fatores do aquecimento global (GANS et al., 2012). Por outro lado a abundância dos membros do subgrupo Gp 1 do filo de *Acidobacteria* parece a ser controlado pelo pH do solo (SAIT; DAVIS; JANSSEN, 2006).

No trabalho desenvolvido por Sait, Davis e Jassen (2006) os autores notaram que o pH do meio de cultivo influenciou fortemente o desenvolvimento de colônias de membros do subgrupo Gp1 do filo *Acidobacteria*. Significativamente um número maior de colônias deste subgrupo teria maior

crescimento com pH 5,5 do que a pH 7,0. Nesse mesmo trabalho, comparando com as taxas de CO₂ apresentadas, nota-se um aumento no filo *Acidobacteria* sob condições de maiores emissões.

As bibliotecas CQCN e CQCCAL apresentaram uma diversidade maior nos subgrupos do filo de *Acidobacteria*. O subgrupo Gp 4 esteve presente só nas áreas em que o solo apresentava o cultivo da cana-de-acúcar, por outro lado somente a amostra da MN apresentou o subgrupo Gp 15. Ambas as amostras de CQ apresentaram o subgrupo Gp 13, os Gp 17 e Gp 18 foram encontrados apenas na amostra CQCCAL.

O segundo filo mais abundante foi *Proteobacteria* com valores de 24,5% para amostra de MN, 26,5% para CQCN, 22,6% para CQCCAL e 24,3% para CCCN das sequências analisadas (Figura 15).

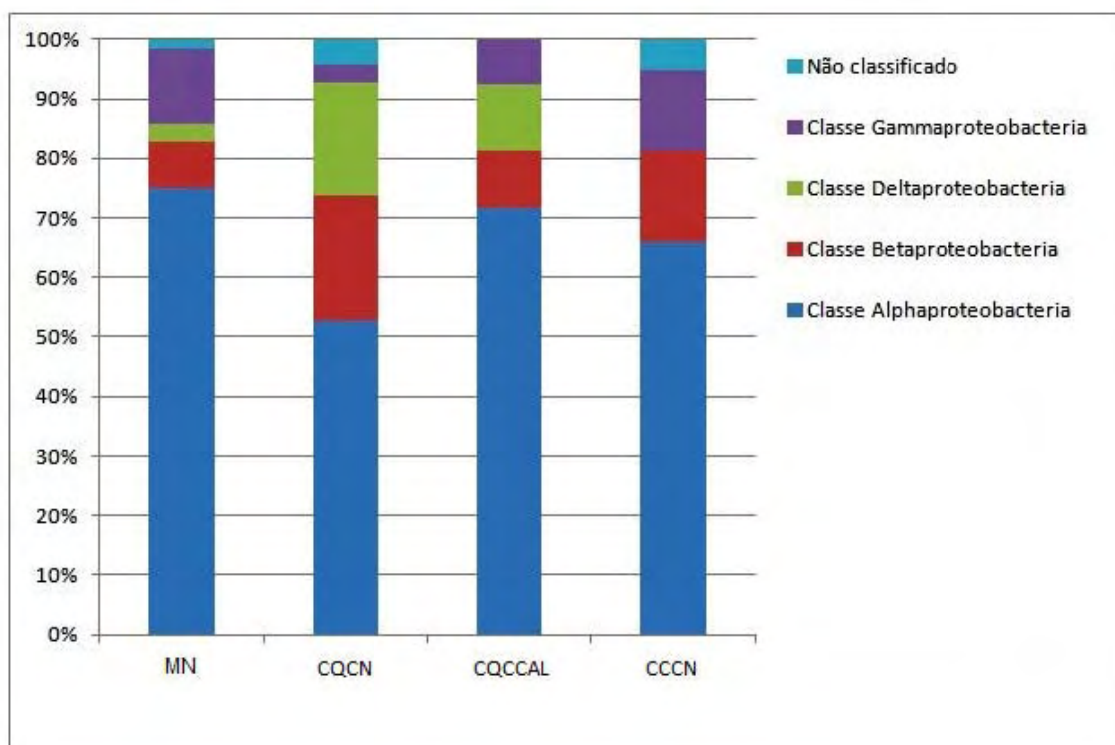


Figura 15. Composição das diferentes classes dentro do filo *Proteobacteria* baseadas na classificação das sequências parciais do gene 16S rRNA, usando a ferramenta Classifier do banco de dados RDP-II.

Esse filo constitui-se como o maior e mais diverso grupo de bactérias, apresentando grande diversidade de morfologia e metabolismo, ocorrendo em

diferentes ambientes e contando com aproximadamente 528 gêneros descritos (GARRITY; BELL; LIBURUN, 2004). Possui cinco subdivisões: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Os microrganismos que fazem parte deste filo são considerados eficientes na degradação de hidrocarbonetos, incluindo componentes aromáticos, alifáticos e outros (ATLAS, 2005).

Nas populações dos diferentes solos avaliadas a classe predominante dentro do filo *Proteobacteria* foi a *Alphaproteobacteria* em todas as bibliotecas, com valores de 75% em MN, 52,2% em CQC, 71,7% em CQCCAL e 66,1% em CCCN. Segundo Axelrood et al. (2002) a classe *Alphaproteobacteria* é abundante em camadas superiores do solo, relacionando esta abundância com a quantidade de matéria orgânica existente nessas camadas. Uma variedade de estratégias metabólicas é encontrada na classe, incluindo organismos com capacidade de realizar a fotossíntese, fixação de nitrogênio e oxidação de amoníaco (WILLIAMS; SOBRAL; DICKERMAN, 2007).

Neste estudo, foram identificadas sequências da subdivisão *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, nas quatro bibliotecas com exceção de sequências do filo *Deltaproteobacteria* na biblioteca CCCN. Representantes dessa classe *Deltaproteobacteria* nas duas bibliotecas de CQ estiveram presentes em um número maior de 18,8% e 11,3% respectivamente, e na MN com 3,1%. As bactérias da classe *Deltaproteobacteria* são conhecidas como mixobactérias, gram-negativas que ocorrem em vários os lugares, são adaptadas para ambientes aeróbios do solo, com a mudança de disponibilidade de nutrientes. Elas são caracterizadas por uma forma de vida incomum pois se movimentam por deslizamento ou rastejando sobre as superfícies, e tem um estilo de vida predatório. São capazes de se alimentar e se defender contra microrganismos usando exoenzimas (por exemplo, proteases, lipases, nucleases, glucanases), elas lisam diferentes macromoléculas biológicas, bem como microrganismos inteiros tais como bactérias e leveduras (DAWID, 2000; THOMAS et al., 2008).

O filo *Firmicutes* formou o terceiro grupo mais abundante (Figura 14) nos solos sob MN ou cultivado de cana-de-açúcar, sendo que a maioria das sequências pertencia às classes *Bacilli* e *Clostridia*. Essas bactérias foram

detectadas em todas as amostras de solos com valores de que variaram de 5% para as amostras MN, 10,8% para CQCN, 6,4% para CQCCAL e 16,6% para CCCN.

Nos estudos de O'Neill et al. (2009), a abundância do filo *Firmicutes* recuperados da superfície de solos antropogênicos (Terra preta de Índio) na região Amazônica, especialmente aos solos adjacentes, podem representar uma efêmera ecologia dos microrganismos adaptados a um rápido crescimento quando os nutrientes se tornam disponíveis e a formação de esporo quando os nutrientes são escassos ou a umidade é limitada. Assim pode-se hipotizar que num primeiro momento representantes do filo *Firmicutes* cresceriam em função da matéria orgânica disponível no solo e em um segundo momento com a escassez de nutrientes, formariam esporos. Quando é feita a extração do solo o DNA total é quantificado inclusive o dos esporos.

O quarto filo mais abundante nas quatro bibliotecas estudadas foi *Verrucomicrobia*, a maioria das sequências são pertencentes às classes *Spartobacteria* e *Subdivision 3*, que foram detectadas em todas as amostras de solos com valores menores que 10% no total das sequências obtidas. Este filo está presente em comunidades microbianas do solo, água doce e marinha; e recentemente encontrados como extremófilos acidófilos em fontes termais (LEE et al., 2009)

As bibliotecas CQCN e CQCCAL apresentaram os mesmos 11 filios, a MN apresentou 8 filios e CCCN 10 filios. Representantes dos filios *Cyanobacteria* e *Nitrospira* foram encontrados somente nas bibliotecas CQCN e CQCCAL, e os organismos do filo *Bacteroidetes* foram encontrados na biblioteca da amostra de CCCN com 0,4%. O filo *Cyanobacteria* engloba bactérias que possuem estrutura típica de células gram-negativas, fotoautotróficas, utilizam o CO₂ como fonte de carbono e H₂O como agente redutor (WOESE et al., 1985; GARRITY e HOLT, 2001). Existem algumas espécies de vida livre e outras são capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio atmosférico contribuindo para a fertilidade do solo. (RAI, 1990; ADAMS, 2000).

Uma pequena parcela de 0,4% do filo *Nitrospira* também foi encontrado nas bibliotecas CQCN e CQCCAL. Segundo Garrity e Holt (2001), este filo, que possui apenas uma família, engloba bactérias gram-negativas metabolicamente diversificadas, sendo a maioria aeróbica e quimiolitotrófica, incluindo algumas

espécies nitrificadoras e redutoras de sulfato. Esse grupo de bactérias é atuante no ciclo de nitrogênio em ambientes aquáticos através da oxidação do nitrato, porém, indivíduos desse grupo têm sido encontrados em amostras de solos (DUNBAR et al., 1999). O filo *Bacteroidetes* encontrado no solo CCCN, é composto por bactérias gram-negativas que não formam endósporos, grupo dividido em três classes: *Bacteroidetes*, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria*. A classe encontrada foi *Sphingobacteria* presente em ambientes marinhos, de água doce, sedimentos e solos (LYDELL et al., 2004).

Os microrganismos não classificados estiveram presentes em grande número em todas as bibliotecas, representando 14,9% das sequências de MN, 13,1 % em CQCN, 20,5% em CQCCAL e 17,5 % em CCCN (Figura 15). Os estudos de Silveira et al. (2006), comparando por análise metagenômica amostras de solos sob arboreto de eucalipto e uma solo de floresta no Estado de São Paulo, revelaram que 7 a 15% das sequências obtidas eram bactérias não classificadas taxonomicamente, segundo o autor isto era esperado uma vez que a diversidade bacteriana no solo é muito alta e ainda desconhecida.

As diferenças entre os grupos taxonômicos das seguintes bibliotecas foram comparadas pelo RDP II através do programa *Library Compare* (Figura 16 e 17). A biblioteca MN em relação à CCCN (Figura 16 A) apresentou diferença significativa nos membros dos filos de *Firmicutes* e *Acidobacteria*. No filo *Firmicutes* a classe *Bacilli* esteve presente com 14,4% do total das sequências na biblioteca CCCN e 2,7% na MN. Nos representantes das acidobactérias as bibliotecas apresentaram diferenças significativas nos subgrupo Gp1 e Gp2 que estavam com maior abundância na MN.

Por outro lado a MN comparada com CQCCAL (Figura 16 B) os filos em comuns não apresentaram diferenças significativas. A biblioteca que se apresentou mais distinta uma da outra foi a MN quando comparada com CQCN (Figura 16 C), obtiveram diferenças significativas dentro de quatro filos em comum (*Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes*, *Acidobactérias* e *Firmicutes*), reforçando o resultado apresentado pela análise de agrupamento das bibliotecas, gerado pelo MOTHR (Figura 13).

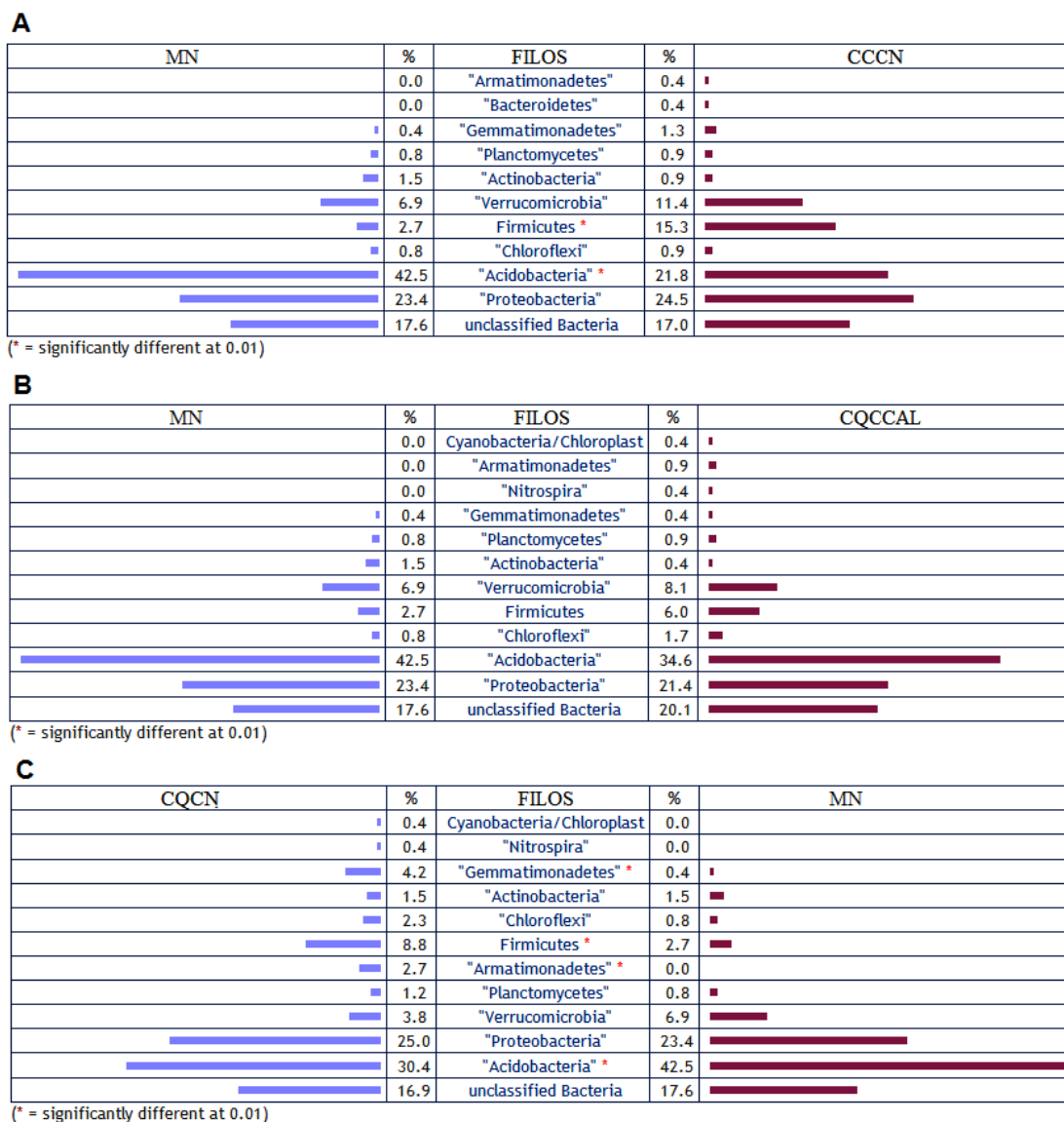


Figura 16. Diversidade bacteriana nas sequências do gene 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II pelo programa Library Compare. **A** (MN – CCCN); **B** (MN- CQCCAL) e **C** (CQCN- MN). * diferença significativa.

As bibliotecas CQCN e CQCCAL apresentaram diferenças significativas no filo *Gemmatimonadetes* (Figura 17 A), a biblioteca CQCN apresentou 4,1% no total das sequências e a CQCCAL apenas 0,4%. Os membros do filo *Gemmatimonadetes* possuem apenas uma espécie isolada (*Gemmatimonas aurantiaca*), bactéria gram-negativa, aeróbia e mesofílica encontrada em lamas de um sistema de tratamento de esgoto (JANSSEN, 2006; ZHANG et al., 2003).

A biblioteca CQCAL em relação à CCCN (Figura 17 B) apresentou diferença significativa nos membros dos filos de *Firmicutes* e *Acidobacteria*. No filo *Firmicutes* a classe *Clostridia* não esteve presente no total das sequências e na biblioteca CCCN e 0,9% na CQCAL. A classe *Bacilli* esteve presente com 14% do total das sequências na biblioteca CCCN e 5,1% na CQCAL. Nos representantes do filo *Acidobacteria* as bibliotecas apresentaram diferenças significativas no subgrupo Gp1, que estavam com maior abundância na CQCAL.

As bibliotecas CQCN e CCCN (Figura 17 C) apresentaram diferenças significativas dentro do filo *Verrucomicrobia*. A classe *Spartobacteria* foi mais abundante na biblioteca CCCN com 4,4% do total das sequências, enquanto na CQCN com 2,3% e mostrou ser similar à frequência encontrada em solos estudados por Janssen (2006) que obtiveram de 4 a 9% desta classe nos seus resultados. Por outro lado a classe *Subdivision 3* do filo de *Verrucomicrobia* esteve presente com 1,2% na CQCN e 0,4% na CCCN, sendo que organismos pertencentes a esta classe ainda não foram caracterizados (ISLAM et al., 2008). Dos organismos não classificados do filo *Verrucomicrobia*, foi encontrado na biblioteca CCCN 6,1% e apenas 0,4% na CQCN.

Considerando as mudanças do uso terra as bibliotecas da mata nativa em relação as com cultivo de cana-de-açúcar (Figura 18 A) apresentaram diferença significativa nos membros dos filos de *Firmicutes* e *Acidobacteria*. Por outro lado na mudança do uso agrícola (Figura 18 B) as bibliotecas com cultivo de cana-de-açúcar apresentaram diferença significativa nos membros dos filos de *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Acidobacteria* entre si.

A

CQCN	%	FILOS	%	CQCCAL
	0.4	Cyanobacteria/Chloroplast	0.4	
	0.4	"Nitrospira"	0.4	
	4.2	"Gemmatimonadetes" *	0.4	
	1.5	"Actinobacteria"	0.4	
	2.3	"Chloroflexi"	1.7	
	8.8	Firmicutes	6.0	
	2.7	"Armatimonadetes"	0.9	
	1.2	"Planctomycetes"	0.9	
	3.8	"Verrucomicrobia"	8.1	
	25.0	"Proteobacteria"	21.4	
	30.4	"Acidobacteria"	34.6	
	16.9	unclassified Bacteria	20.1	

(* = significantly different at 0.01)

B

CCCN	%	FILOS	%	CQCCAL
	0.0	"Nitrospira"	0.4	
	0.0	Cyanobacteria/Chloroplast	0.4	
	0.9	"Planctomycetes"	0.9	
	0.9	"Actinobacteria"	0.4	
	1.3	"Gemmatimonadetes"	0.4	
	0.4	"Armatimonadetes"	0.9	
	0.4	"Bacteroidetes"	0.0	
	15.3	Firmicutes *	6.0	
	11.4	"Verrucomicrobia"	8.1	
	24.5	"Proteobacteria"	21.4	
	21.8	"Acidobacteria" *	34.6	
	0.9	"Chloroflexi"	1.7	
	17.0	unclassified Bacteria	20.1	

(* = significantly different at 0.01)

C

CCCN	%	FILOS	%	CQCN
	0.0	"Nitrospira"	0.4	
	0.0	Cyanobacteria/Chloroplast	0.4	
	0.9	"Planctomycetes"	1.2	
	0.9	"Actinobacteria"	1.5	
	1.3	"Gemmatimonadetes"	4.2	
	0.4	"Armatimonadetes"	2.7	
	0.4	"Bacteroidetes"	0.0	
	15.3	Firmicutes	8.8	
	11.4	"Verrucomicrobia" *	3.8	
	24.5	"Proteobacteria"	25.0	
	21.8	"Acidobacteria"	30.4	
	0.9	"Chloroflexi"	2.3	
	17.0	unclassified Bacteria	16.9	

(* = significantly different at 0.01)

Figura 17. Diversidade bacteriana nas sequências do gene 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II pelo programa Library Compare A (CQCN – CQCCAL); B (CCCN- CQCAL) e C (CQCN- CQCN). * diferença significativa.

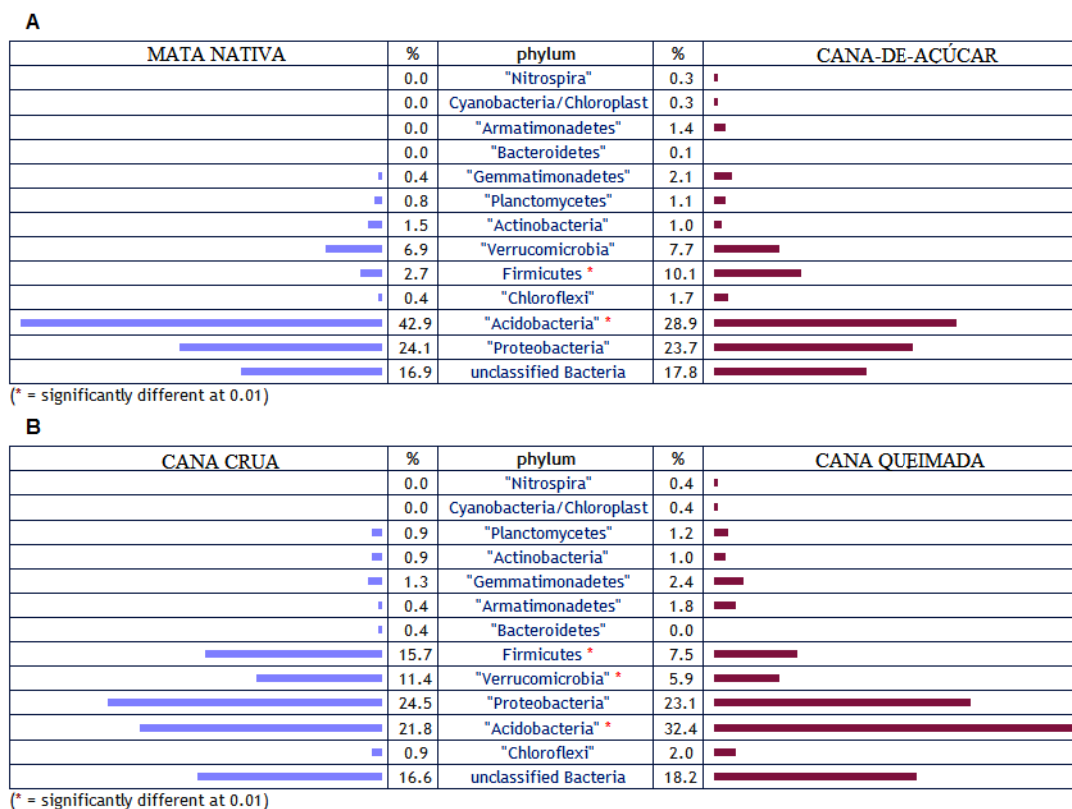


Figura 18. Diversidade bacteriana nas sequências do gene 16S rRNA com base na afiliação filogenética do RDP II pelo programa Library Compare. A (mudanças no uso da terra); B (mudanças no uso agrícola) * diferença significativa.

V. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos, pelos atributos físico-químicos mostraram que as comunidades foram influenciadas pela mudança de atributos no solo tais como matéria orgânica, pH e classe textural. A técnica T-RFLP revelou diferenças estruturais na composição das comunidades bacterianas que ocorrem nos solos mata nativa, cana queimada e cana crua; fatores como a presença e ausência da palhada nos solos de cana crua e os vários tratamentos (sem preparo, convencional, convencional mais calcário, convencional mais calcário e gesso) nos solos sob o cultivo de cana, não revelaram diferenças estruturais na composição das comunidades bacterianas; já as profundidades do solo de 20 cm e 40 cm revelaram grandes diferenças estruturais na composição das comunidades bacterianas. Na análise de

riqueza de UTOs os solos com cultivo de cana-de-açúcar mostraram maior riqueza quando comparado com solo da mata nativa.

Pelo sequenciamento das bibliotecas, verificou-se nesse estudo que: os solos com cultivo de cana-de-açúcar mostraram maior diversidade bacteriana quando comparados com solo sob a Mata Nativa; existem diferenças entre a diversidade nas comunidades bacterianas encontradas em solos com colheita manual e queimada e colheita mecanizada da cana-de-açúcar; alguns grupos bacterianos apareceram apenas em solos cultivados com cana-de-açúcar com colheita manual e queima; a mudança no subgrupo do filo *Acidobacteria* das áreas onde tiveram queima e sem queima, pode estar relacionada com as mudanças do uso da terra e do uso agrícola.

Desta forma pode-se sugerir que as diferenças encontradas na microbiota dos solos onde se cultiva cana-de-açúcar com colheita mecanizada ou manual com queima, provavelmente estão relacionadas as mudanças do uso agrícolas e do manejo. Essas ações fazem com que ocorram alterações em populações nos solos, que podem ter um papel essencial na reciclagem dos elementos químicos do solo, influência sobre as emissões de gases do efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO₂), reduzindo os estoques de carbono do solo e acelerando possíveis alterações climáticas globais por conta do efeito estufa ampliado na atmosfera. Estudos metagenômicos posteriores, considerando organismos específicos que aparecem ou desaparecem da população bacteriana dos solos submetidos a diferentes manejos serão importantes para a definição de procedimentos agrícolas, no futuro, que perturbem o mínimo possível o ambiente.

VI. REFERÊNCIAS

ADAMS, D.G. Symbiotic interactions. In: Whitton B, Potts M, editors. Ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p. 523-561, 2000.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

ARE, K.S.; OLUWATOSIN, G.A.; ADEYOLANU, O.D.; OKE, A.O. Slash and burn effect on soil quality of an Alfisol: Soil physical properties. **Soil e Tillage Research**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p.4-10, 2009.

ATLAS, M. R. Microbiol degradation of petroleum hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. Hooken, v.80, p. 723-736, 2005.

AXELROOD,P.E.; CHOW, M.L.; RADOMSKI, C.C.; McDERMOTT, J.M.; DAVIES, J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjectrd to disturbance. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48,p. 655-674, 2002.

BARNS, S.M.; CAIN, E.C.; SOMMERVILLE, L.; KUSKE, C.R. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the know diversity within the phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, n. 9, p. 3113-3116, 2007.

BLACKWOOD, CB.; PAUL, E.A. Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. **Soil Biol Biochem** 35:1245–1255, 2003.

BLAIR, N. Impact of cultivation and sugar-cane green trash management on carbon fractions and aggregate stability for a Chromic Luvisol in Queensland, Australia. **Soil e Tillage Research**, Amsterdam, v. 55, n. 3-4, p. 183-191, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Balanço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia. Brasília: MAPA, **Secretaria de Produção** . p.139. 2007.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium Boric Acid: Atriz-Less, Cooler Conductive Medium for DNA Electrophoresis. **Biotechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

BRUCE, T.; MATINEZ, I.B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 60, n. 4, p.840-849, 2010.

BUNEMANN, E.K.; SCHWENKE, G.D.; VAN ZWIETEN, L. Impact of agricultural inputs on soil organisms – a review. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 44, p. 379-406, 2006.

CAMPOS, D.C. **Potencialidade do sistema de colheita sem queima da cana-de-açúcar para o sequestro do carbono**. 2003. 12 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.; VITTI, A.C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In:YAMADA, T., ABDALLA, S.R.S., VITTI,G.C.(Ed) **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, p.355-392, 2007.

CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Agricultura e aquecimento global. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 40-44, 2007.

CHAN, O.C.; CASPER, P.; SHA, L.Q.; FENG, Z.L.; FU, Y.; YANG, X.D.; ULRICH, A.; ZOU, X.M. Vegetation cover of Forest, shrub and pasture strongly influences soil bacterial community structure as revealed by 16S rRNA gene T-RFLP analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 449-458, 2008.

CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Malden, v. 43, p. 783-791, 1987.

CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Malden, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistics Association**, New York, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHAO, A.; MA, M.C.; YANG, M.C.K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**, Oxford, v. 80, p. 193-201, 1993.

CHENG-FANG, LI.; ZHI-KUI, K.; JIN-HUA, Y.; MING-Li.; CAI., JIN-PING, W.; COU-Gui, CAO. Soil CO₂ fluxes from direct seeding rice fields under two tillage practices in central China. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 44, n. 23, p. 2696-2704, 2010.

CLARKE, K.R. Nonparametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, Carlton, v. 18, p. 117-143, 1993.

COLE, JR.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; et al. The Ribosomal Database Project: Improved Alignments And New Tools For rRNA Analysis. **Nucleic Acids res** 37: d141-145, 2009.

COLWELL, R. K.; J. A. CODDINGTON. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Phil. Trans. Royal Soc. London, Biol.** 345: 101-118, 1994.

CONAB, 2012. Companhia Nacional de Abastecimento. Retrieved June 05, 2012, from <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf>.

CURY, J.C. **Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, London, v. 3, n. 6, p. 470-480, 2005.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. Sugarcane improvement through breeding. New York: **Elsevier**, p.84, 1987.

DAWID, W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 403–427, 2000.

DE FEDE K. L.; PANACCIONE D. G.; SEXTONE A.J. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v.33, p.1555-562, 2001.

DELMONT, T.O.; MALANDAIN, C.; PRESTAT, E.; LAROSE, C.M.; MONIER. J.N.; SIMONET. P., VOGEL.T. M. Metagenomic mining for microbiologists. **The ISME Journal, Ecully**, p. 1837–1843, 2011.

DIAS, F.L.F.; ROSSETO, R. Calagem e Adubação da Cana-De-Açúcar. In: Segato, S. V. et al. (Org). **Atualização em Produção de Cana-De-Açúcar**. Piracicaba: cp, p.107-119, 2006.

DICKIE, I. A.; R. G. FITZJOHN. Using terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi, **a methods review**. *Mycorrhiza*, 17:259–270, 2007.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F. D.; COSTA, R.; TAKETANI, R. G.; VAN ELSAS, J.D.; ARAUJO, W. L. Bacterial soil community in a Brazilian Sugarcane field. **Plant Soil**, 336, p. 337–349, 2010.

DUNBAR, J. et al. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.4, p. 1662-9, 1999.

DUNBAR, J.; BARNS, S.M.; TICKNOR, L.O.; KUSKE,C.R. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.6, p.3035-3045, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - **Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Solos**. Sistema Brasileiro de Classificação De Solos. Rio de Janeiro, 2.ed, p.306, 2006.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food and Agriculture Organization of the United Nations statistical database. Available at: <http://faostat.fao.org/>. Accessed June 24, 2010.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS Jr.; W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

FERRER, M.; BELOQUI, A.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 16(1-2), p. 109-123, 2009.

FIERER, N.; JACKSON, RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v. 103, p. 626-631, 2006.

FIGUEIREDO, E.B. **Balanço de gases de efeito estufa e emissões de CO₂ do solo nos sistemas de colheita da cana-de-açúcar manual queimada e mecanizada crua**. 2012. 28 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista. FCAV. UNESP, Jaboticabal, 2012.

FORNAZARI, A. C.Z. **Determinação da comunidade microbiana pelo método molecular T-RFLP em carnes refrigeradas embaladas a vácuo 2011**. 33 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2011.

GALDOS, M. V.; CERRI, C. C.; CERRI C. E. P. Soil carbon stocks under burned and unburned sugarcane in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v.153, n.3-4, p.347–352, 2009.

GANS, J.D.; DUNBAR, J.; EICHORST, S.A.; GALLEGOS-GRAVES, L.V.; WOLINSKY, M.; KUSKE, C.R. A robust PCR primer design platform applied to the detection of Acidobacteria Group 1 in soil. **Nucleic Acids Research**, Los Alamos, p. 1–11, 2012.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LIBURUN, T.G. Taxonomic Outline of Prokaryotes. In: **Berey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2^o ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004.

GARRITY, G.M.; HOLT, J. H. A road map to the manual. In: BOONE, D.R., CASTENHOLZ, G.M., GARRITY (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., v. 1. Berlin: Springer-Verlag KG,. p. 119-166, 2001.

GARRITY, J.B. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. New York: Springer-Verlag, p.1108, 2005.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086-2097, 2008.

GONÇALVES, N.J.N. **Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica do estado de São Paulo**. 2011. 29 p. Dissertação (Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2011.

GRAYSTON, S.J.; GRIFFITH, G.S.; MAWDSLEY, J.L.; CAMPBELL, CD.; BARDGETT, R.D. Accounting for variability in soil microbial communities of temperature upland grassland ecosystems. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v.33, p.533-51, 2001.

GRÜNTZIG, V.; STRES, B.; AYALA DEL RÍO, H.L.; TIEDJE, J. M. **Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis**. East Lansing: Ribosomal Database Project, Michigan State University, 2002.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** v 68(4), p. 669-685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknownsoil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry e Biology**, 5:245-249, 1998.

HARTMAN, W. H.; RICHARDSON, CURTIS J.; VILGALYS, R.; BRULAND, G. L. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 46, p. 17842–17847, 2008.

HARTMANN, M.; WIDMER, F. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7804-7812, 2006.

HAYDEN, H.L.; DRAKE, J.; IMHOF, M.; OXLEY, A. P. A.; NORNG, S.; MELE, P.M. The abundance of nitrogen cycle genes amoA and nifH depends on land-

uses and soil types in South-Eastern Australia. **Soil Biology e Biochemistry**, Oxford, v.42,n.10, p.1774-1783, 2010.

HUEY, B.; HALL, J. Hypervariable Dna Fingerprinting In *Escherichia Coli*: Minisatelite Probe From Bacteriophage M13. **Journal Bacteriologic**, v.171, p. 2528-2532, 1989.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v 67, p.4399-06, 2001.

ISLAM, T.; JENSEN, S.; REIGSTAD, L.J.; LARSEN, O.; BIRKELAND, N.K. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum. **Proc Natl Acad Sci USA**, 105, 300–304, 2008.

JABRO, J.D.; SAINJU, U.; STEVENS, W.B.; EVANS, R.G. Carbon dioxide flux as affected by tillage and irrigation in soil converted from perennial forages to annual crops. **Journal of Environmental Management**, New York, v. 88, n. 4, p. 1478-1484, 2008.

JANSSEN, P. H. Identifying *the* Dominant Soil Bacterial Taxa *in* Libraries. *of* 16S rRNA *and*. 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719- 1728, 2006.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME Journal**, Heteren, p. 1-8, 2009.

JOHNSON, M.J.; LEE, K.Y.; SCOW, K.M. DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**. n.114, p.279-303, 2003.

JONES, R.; ROBESON, M.; LAUBER, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology** (ISME). 3:442-453, 2009.

KIELAK, A.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Comparative Analysis of Acidobacterial Genomic Fragments from Terrestrial and Aquatic Metagenomic Libraries, with Emphasis on *Acidobacteria* Subdivision 6. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 6769–6777, 2010.

KIELAK, A.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. **ISME Journal**, New York, v.3, p.378-382, 2009.

KIRK, J.E.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **J. Microbiol. Meth**, v.58,p.169–188, 2004.

KOCH, I.H.; GICH, F.; DUNFIELD, P.F.; OVERMANN, J. Edaphobacter modestus gen. nov., sp. nov., and Edaphobacter aggregans sp. Nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.58, p. 114-1122, 2008.

LA SCALA, N.; LOPES, A.; AFONSO, L.; SPOKAS, K.; BOLONHEZI, DENIZART., ARCHER, D.; REICOSKY, D. C. Short-term temporal changes of soil carbon losses after tillage described by a first-order decay model. **Soil e Tillage Research**, v. 99, p. 108-118, 2008.

LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**,75: 5111–5120, 2009.

LEE, K.C.; WEBB, R.I.; JANSSEN, P.H.; SANGWAN, P.; ROMEO, T.; STALEY, J.T.; FUERST, J.A. Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum Planctomycetes. **BMC Microbiology**, v. 9,n. 5., 2009.

LESAULNIER, C.; PAPAMICHAIL, D.; MCCORKLE, S.; OLLIVIER, B.; SKIENA, S.; TAGHAVI, S.; ZAK, D.; VAN DER LELIE, D. Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. **Environmental Microbiology**, v.10, p. 926–941, 2008.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4516–4522, 1997.

LYDELL, C.; DOWELL, L.; SIKAROODI, M.; GILLEVET, P.; EMERSON, D. A population survey of members of the phylum *Bacteroidetes* isolated from salt marsh sediments along the east coast of the United States. **Microbial Ecology**, New York, v. 48, p. 263-273, 2004.

MACEDO, I. DE C.; NOUGUEIRA, L.A.H. Avaliação da expansão da produção de etamol no Barsil. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Julho 2004.71p. <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-14092007-140801/>>. Acesso em: 11 jul. 2011.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, Amsterdam, v. 34,p.265-276, 2008.

MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.2, p. 323–327, 1999.

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MARTINS, N.G.S. **Os fosfatos na cana-de-açúcar**. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2004.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Rev. Bras. Cienc.Solo**, v.27, p. 425-433, 2003.

MENDES, L.W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP**. 2009. 24 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MOESENEDER, M.M.; WINTER, C.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 44, p. 159-172, 2001.

MORAIS, M. **Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar**. 2008, 89 p. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2002. **Microbiologia e bioquímica do solo**, Lavras, Editora da UFLA, p. 626, 2002.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p.127–141, 1998.

NACKE, H.; THÜRMER, A.; WOLLHERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHONING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types

in German forest and grassland soils. **PLoS One**, San Francisco, v. 6,n.2, e17000, 2011.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos do petróleo**. 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ONEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, S.M.; GOMES, J.E.; LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J.E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, n. 1, p. 23-35, 2009.

OVREAS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters, Malden**, v. 3, 236-251, 2000.

PANOSSO, A. R. **Variabilidade espacial da emissão de co2 e sua relação com propriedades do solo em área de cana-de-açúcar no sudeste do brasil**. 2011. 54 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista. FCAV. UNESP, Jaboticabal, 2011.

PANOSSO, A. R.; MARQUES JR. J.; MILORI, D.M.B.P.; FERRAUDO, A. S.; BARBIERI, D.M.; PEREIRA, G.T.; LA SCALA, N. Soil CO₂ emission and its relation to soil properties in sugarcane areas under Slash-and-burn and Green harvest. **Soil e Tillage Research**, v. 111, p. 190-196, 2011.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of *16S rRNA* genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Curitiba v.44: p.1215-1221, 2011

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RAI, A. N. Handbook of Symbiotic *Cyanobacteria*. **CRC Press**, Boca Raton, Florida, USA, 1990.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 62, p. 142-160, 2007.

RASCHE, F.; KNAPP, D.; KAISER, C.; KORANDA, M.; KITZLER, B.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A.; SESSITSCH, A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. **ISME Journal**, New York, v. 5, n. 3, p. 389-402, 2011.

RASTOGI, M.; SINGH, S.; PATHAK, H. Emission of carbon dioxide from soil. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 5, p. 510-517, 2002.

RAZAFIMBELO, T.; BARTHES, B.; LARRE-LARROUY, M. C.; DE LUCA, E. F.; LAURENT, J. Y.; CERRI, C. C.; FELLER, C. Effect of sugarcane residue management (mulching versus burning) on organic matter in a clayey Oxisol from southern Brazil. **Agriculture Ecosystem e Environment**, Amsterdam, v. 115, n. 1-4, p.285-289, 2006.

REATTO, A.; SPERA, S. T.; MARTINS, E. de S.; CORREIA, J. R.; CUNHA, T. J. F. A Desertificação em Solos Arenosos no Brasil. **EMBRAPA SOLOS**.Ed,2,2001<http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Solo%20arenoso> Acesso em: 15 maio. 2012.

REICHSTEIN, M.; TENHUNEN, J.D.; ROUPSARD, O. Ecosystem respiration in two Mediterranean evergreen Holm Oak forests, drought effects and decomposition dynamics. **Functional Ecology**, v. 16, p. 27–39, 2002.

REICOSKY, D.C.; LINDSTROM, M.J. Effect of fall tillage method on short term carbon dioxide flux from soil. **Agronomy Journal**, v. 85, p.1237-1243, 1993.

RETH, S.; MARKUS, R.; FALGE, E. The effect of soil water content, soil temperature, soil pH-value and the root mass on soil CO₂ efflux: a modified model. **Plant and Soil, Dordrecht**, v. 268, n. 1/2, p. 21-33, 2005.

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L. **Biomassa de cana-de-açúcar** : colheita, energia e ambiente, Piracicaba, 302p, 2004.

RODRIGO, A.; RECOUS, S.; NEEL, C.; MARY, B. Modelling temperature and moisture effects on C-N transformations in soils: comparison of nine models. **Ecological Modeling**, Amsterdam, v. 102, n.2-3, p.325-339, 1997.

ROESCH, L.F.W.; PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W.; CAMARGO, F.A.O., Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Associadas a Plantas de Milho. **R. Bras. Ci. Solo**, v.31, p.1367-1380, 2007.

SAIT, M.; DAVIS, K.E.; JANSSEN, P.H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 72, 1852–1857. 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANZ, J.L.; KOCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 119-133, 2007.

SAS Institute. SAS^R **User's Guide**: Statistics. SAS Institute, Inc. Cary, NC,USA, 1989-1996.

SCHLOSS, P.D.; WESCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMAN, M.; HOLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: Open Source, Platform-independent, Community-supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of Microb Ecol statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 5485-5492, 2004.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 75,p. 955–962, 2007.

SCHÜTTE, U. M. E., P.; ABDO, Z.; BENT, S.J.; SHYU, C.; WILLIAMS, C.J.; PIERSON, L. Forney Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 80, pp.365–380, 2008.

SILVA, K.J. **Diversidade Bacteria e Archaea em Epodossolos do litoral do Estado de São Paulo**. 2010. 19 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2010.

SILVA-OLAYA, A. M. **Emissão de dióxido de carbono após diferentes sistemas de preparo do solo na cultura da cana-de-açúcar**. 2010. 29 f. Dissertação (Mestrado em Ciência). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2010.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *Pesqui Agropecu Bras* 41: 1507–1516, 2006.

SINGLETON, D.R.; MICHELLE A.F.; STEPHEN, L.R.A.; WILLIAM, B.W. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374–4376, 2001.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN, M.S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.5, p.2.284-2.291, 2001.

SOUSA, D. M. G. et al. Uso de gesso, calcário e adubos para pastagens no cerrado. planaltina:**Embrapa Cerrados**, p.22, 2001.

SOUZA, R. A.; TELLES, T. S.; MACHADO, W.; HUNGRIA, M.; TAVARES FILHO, J.; GUIMARÃES, M. de F. Effects of sugarcane harvesting with burning on the chemical and microbiological properties of the soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.155, p. 1-6, 2012.

SZMRECSÁNYI, T. Tecnologia e degradação ambiental: o caso da agroindústria canavieira no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.10, p.73-81, 1994.

TANG, J.W.; BALDOCCHI, D.D. Spatial-temporal variation in soil respiration in an oakgrass savanna ecosystem in California and its partitioning into autotrophic and heterotrophic components. **Biogeochemistry**, v. 73, n. 183-207, 2005.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal, Madison**, v. 71, p. 579-591, 2007.

THOMAS, S. H.; WAGNER, R. D.; ARAKAKI, A. K.; SKOLNICK, J.; KIRBY, J. R.; SHIMKETS, L. J.; SANFORD, R. A.; LÖFFLER, F. E. The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-Proteobacteria. **Plos One**, v. 3(5), p. 2103, 2008.

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M., BALL, B. C., CAMPEBELL, C. D., WATSON, C. A. (Org.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, p. 393-412, 2001.

TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T.L.; FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 109-122, 1999.

TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; ØVREAS, L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v.64, p.53-62, 1998.

TORSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, n.3, p.240-245, 2002.

TRINGE, S.G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 805–814. 2005.

UPCHURCH, R.; CHIU, C.Y.; EVERETT, K.; DYSZYNSKI, G.; COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W.B. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. **Soil Biol Biochem**, V. 40, p. 1294-1305, 2008.

WAID, J.S. Does soil biodiversity depend upon metabolic activity and influence? **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.13, p 151-158, 1999.

WARD, NL.; CHALLACOMBE, JF.; JANSSEN, PH.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, PM.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, DH.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, RD.; BRADLEY, B.; BRETTIN, TS.; BRINKAC, LM.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, SC.; DAVIDSEN, TM.; DEBOY, RT.; DETTER, JC.; DODSON, RJ.; DURKIN, AS.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C. S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, SP.; MADUPU, R.; NELSON, K. E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, MJ.; SELENGUT, JD.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L. S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v 75, n. 7, p .2046– 2056, 2009.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.95, p.6.578–6.583, 1998.

WILLIAMS, K.P.; SOBRAL B.W.; DICKERMAN A.W. A robust species tree for the alphaproteobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189 (13), p. 4578–4586, 2007.

WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T.J.; FOX, G.E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 6, p. 143-151, 1985.

XU, L.; BALDOCCHI, D.D.; TANG, J. How soil moisture, rain pulses, and growth alter the response of ecosystem respiration to temperature. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 18, p. 1-10, 2004.

ZHANG, H. Y.; SEKIGUCHI, S.; HANADA, P.; HUGENHOLTZ, H.; KIM, Y.; KAMAGATA, K.; NAKAMURA. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53:1155–1163, 2003.